



Universidade de Aveiro
2011

Departamento de Biologia

**Luísa Alexandra
Antunes Mariano**

Qualidade dos Alimentos Prontos a Servir do Distrito de Aveiro

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Adelaide Almeida Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro e sob co-orientação da Doutora Maria do Rosário de Fátima Lopes de Figueiredo do Laboratório de Saúde Pública de Aveiro.

O júri

Presidente

Professora Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira

Professora Associada com Agregação do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Ana Cristina de Fraga Esteves

Investigadora em Pós-Doutoramento do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM) do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Professora Doutora Adelaide Almeida

Professora Auxiliar do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro (orientadora)

Doutora Rosário de Fátima Lopes de Figueiredo

Técnica Superior do Laboratório Saúde Pública de Aveiro (co-orientadora)

Agradecimentos

Este espaço é dedicado àqueles que deram a sua contribuição para que esta dissertação fosse realizada. A todos eles deixo aqui o meu agradecimento sincero.

À Professora Doutora Adelaide Almeida, minha orientadora, pelo apoio, ajuda e paciência com que acompanhou o meu trabalho e sugestões para a conclusão da minha tese.

À Doutora Maria do Rosário de Fátima Lopes de Figueiredo, pelo apoio e ajuda com que acompanhou o meu trabalho.

À Sónia, com a qual sempre pude contar, nos bons e nos péssimos momentos, pelo esforço de orientação e pelos conselhos.

À minha irmã Ana, pelo apoio e paciência de ter aturado o meu mau humor.

Ao João, pelo amor, apoio e paciência, se não fosse ele não poderia ter conseguido realizar o mestrado.

Palavras-chave

Segurança alimentar, toxinfecções alimentares, bactérias indicadoras, bactérias patogénicas, HACCP, Distrito de Aveiro.

Resumo

Nos últimos anos, observou-se um aumento do consumo de alimentos prontos a comer em estabelecimentos de restauração a nível mundial. Consequentemente, a vigilância microbiológica dos alimentos produzidos nestas unidades tornou-se uma área de grande interesse do ponto de vista da Saúde Pública. O objectivo deste estudo foi avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos prontos a comer (alimentos cozinhados, alimentos mistos e saladas) servidos em restaurantes, escolas e lares do Distrito de Aveiro. Esta avaliação foi realizada de acordo com a legislação elaborada pelo Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. O período de estudo foi de sete anos (2004 a 2010). Foram estudadas 3295 amostras de alimentos e 2031 amostras de utensílios utilizados na confecção dos alimentos. Os alimentos e utensílios foram submetidos e avaliados através de análises microbiológicas de quantificação de microrganismos a 30°C, bolores e leveduras, coliformes totais, *E. coli*, *S. aureus*, *Clostridium* e presença de *Listeria* e *Salmonella*. Os resultados mostraram que os alimentos mistos foram os que apresentaram maior percentagem de amostras não satisfatórias (41%). Dos três tipos de instituições estudadas os restaurantes foram os que apresentaram alimentos com pior qualidade microbiológica (25% de amostras não satisfatórias) e os lares foram as que apresentaram menos amostras não satisfatórias (14% de amostras não satisfatórias). Nas escolas a percentagem de amostras não satisfatórias foi de 15%. Os microrganismos a 30°C foram os que mais frequentemente ultrapassaram o valor legislado (em 19% das amostras). Os microrganismos patogénicos mais implicados na má qualidade dos alimentos foram os *Staphylococcus aureus* (ultrapassaram o valor limite em 1% das amostras). Durante o período de estudo observou-se um aumento progressivo da qualidade microbiológica dos alimentos prontos a comer. Apesar da implementação do sistema HACCP nos estabelecimentos de restauração em Portugal em 1998, a percentagem de alimentos prontos a comer, servidos nestes estabelecimentos, que apresentam má qualidade microbiológica é ainda muito alta (18% em média).

Keywords

Food safety, food poisoning, indicator bacteria, pathogenic bacteria, HACCP, District of Aveiro.

Abstract

In recent years, emerged a trend of increasing consumption of ready to eat food in catering establishments worldwide. Consequently, the microbiological surveillance of food produced in these units has become an area of great interest from the point of view of Public Health. The aim of this study was to evaluate the microbiological quality of ready to eat food (cooked food, mixed food and salads) served in restaurants, schools and nursing homes in the District of Aveiro. This evaluation was performed in accordance with the rules established by the National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge. The study period was seven years (2004 to 2010), and were analyzed 3295 samples of food and 2031 samples of cooking utensils. The food and cooking utensils were evaluated through microbiological quantification of microorganisms at 30 ° C, yeasts and molds, total coliforms, *E. coli*, *S. aureus*, *Clostridium* and presence of *Listeria* and *Salmonella*. The results showed that mixed food presented the highest percentage of unsatisfactory samples (41%). Of the three types of institutions studied, the restaurants were those with the worst microbiological quality of food (25% of unsatisfactory samples) and old nursing homes showed the best quality (14% of unsatisfactory samples). In schools the percentage of unsatisfactory samples was 15%. Microorganisms at 30 ° C were the parameter that more often exceeded the legislated value (19% of samples). The pathogenic microorganisms most commonly implicated in the poor quality of food were *Staphylococcus aureus* (exceeded the limit in 1% of samples). During the study period there was a progressive increase in the microbiological quality of ready to eat food. Despite the implementation of HACCP in restaurants in Portugal in 1998, the percentage of ready to eat food served in these establishments that present a poor microbiological quality is still very high (18% on average).

Índice

1. Introdução.....	1
1.1. Segurança alimentar	2
1.1.1. Boas práticas de higiene	2
1.1.1.1. Higiene pessoal.....	2
1.1.1.2. Higiene e segurança das instalações.....	4
1.2. Implementação e gestão de sistemas de segurança (HACCP).....	6
1.2.1. Origem do sistema HACCP	7
1.2.2. Vantagens do sistema HACCP	7
1.2.3. Os princípios do HACCP	8
1.2.4. Implementação do HACCP	9
1.3. Deterioração e contaminação dos alimentos.....	12
1.3.1. Perigos físicos.....	13
1.3.2. Perigos químicos	13
1.3.3. Perigos biológicos.....	14
1.4. Fatores que favorecem a deterioração de alimentos por microrganismos	16
1.5. Doenças associadas ao consumo de alimentos.....	18
1.6. Microrganismos indicadores e patogénicos usados na avaliação da qualidade microbiológica de alimentos.....	21
1.6.1. Microrganismos indicadores.....	21
1.6.1.1. Aeróbios mesófilos	21

1.6.1.2. Bolores e leveduras	21
1.6.1.3. Coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	22
1.6.2. Microrganismos patogénicos	23
1.6.2.1. <i>Salmonella</i>	23
1.6.2.2. <i>Clostridium</i>	24
1.6.2.3. <i>Listeria</i>	25
1.6.2.4. <i>Staphylococcus aureus</i>	27
1.7. Legislação usada para classificar os alimentos prontos a comer do ponto de vista microbiológico	28
1.8. Objetivo do Estudo	32
2. Material e Métodos.....	33
2.1. Caracterização do local de estudo	33
2.2. Dados utilizados	33
2.3. Legislação utilizada para classificação dos alimentos e utensílios do ponto de vista microbiológico	34
2.4. Análises Microbiológicas dos Alimentos e Utensílios.....	35
2.4.1. Colheita e transporte de Amostras	35
2.4.2. Microrganismos estudados	35
2.4.3. Pesquisa de microrganismos em alimentos.....	35
2.4.3.1. Preparação da amostra	35
2.4.3.2. Métodos de deteção	36

2.4.4. Pesquisa de microrganismos em utensílios	40
3. Resultados.....	41
3.1. Alimentos	41
3.1.1. Caracterização geral das amostras de alimentos do Distrito de Aveiro	41
3.1.2. Classificação microbiológica dos alimentos segundo a legislação do INSA e a classificação em duas categorias	41
3.1.3. Avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos ao longo do período de estudo.....	44
3.1.4. Classificação microbiológica dos alimentos por parâmetro	46
3.2. Utensílios	51
3.2.1. Caracterização geral das amostras de utensílios	51
3.2.2. Avaliação da qualidade microbiológica dos utensílios ao longo do período de estudo.....	52
3.2.3. Avaliação da qualidade microbiológica dos utensílios por parâmetro.....	55
4. Discussão.....	57
5. Bibliografia.....	63

Índice de figuras

FIGURA 1 - MAPA DE PORTUGAL E MAPA DO DISTRITO DE AVEIRO (HTTP://CNMJ.PT/PAG/LINKS.HTML ; HTTP://CLIENTES.NETVISAO.PT/ANTEROJO/PORTUGAL_DIST_AVEIRO.HTM).	33
FIGURA 2 - BOLORES E LEVEDURAS EM MEIO OGY.	36
FIGURA 3 - COLIFORMES TOTAIS A 30°C EM MEIO VRBL.	37
FIGURA 4 - <i>E. COLI</i> EM MEIO CLROMOCULT TBX.....	38
FIGURA 5 - <i>STAPHYLOCOCCUS AURES</i> EM MEIO BAIRD PARKER	38
FIGURA 6 - ESPOROS DE CLOSTRÍDEO SULFITO-REDUTORES EM MEIO IRON SULPHITE MEAT LIVER	39
FIGURA 7 - AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DENTRO DE CADA GRUPO DE ALIMENTOS SEGUNDO CLASSIFICAÇÃO EM DUAS CATEGORIAS.	42
FIGURA 8 - AVALIAÇÃO DAS AMOSTRAS DENTRO DE CADA GRUPO SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO EM DUAS CATEGORIAS..	43
FIGURA 9 - EVOLUÇÃO DA QUALIDADE DAS AMOSTRAS AO LONGO DOS ANOS SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO LEGISLADA	45
FIGURA 10 - EVOLUÇÃO DAS AMOSTRAS DOS ALIMENTOS CLASSIFICADAS SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO EM DUAS CATEGORIAS NOS 3 LOCAIS DE PROVENIÊNCIA AO LONGO DOS ANOS	46
FIGURA 11 - EVOLUÇÃO DA QUALIDADE DAS AMOSTRAS DE UTENSÍLIOS AO LONGO DOS ANOS EM LARES SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO LEGISLADA.	53
FIGURA 12 - EVOLUÇÃO DAS AMOSTRAS DOS UTENSÍLIOS CLASSIFICADAS EM DUAS CATEGORIAS NOS 3 TIPOS DE LOCAIS AO LONGO DOS ANOS.....	54

Índice de tabelas

TABELA 1 - CLASSIFICAÇÃO DOS MICRORGANISMOS DE ACORDO COM O SEU RISCO E DISSEMINAÇÃO SEGUNDO O <i>NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA FOR FOOD</i> (VEIGA, 2009).	15
TABELA 2 - DADOS RELATIVOS AOS AGENTES ETIOLÓGICOS RESPONSÁVEIS POR TOXINFECÇÕES ALIMENTARES ISOLADOS ENTRE 2004 E 2006 NOS LABORATÓRIOS DE MICROBIOLOGIA DE ALIMENTOS (LISBOA E PORTO) DO INSTITUTO NACIONAL DE SAÚDE DR. RICARDO JORGE (INSA).	20
TABELA 3 - VALORES GUIA PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS COZINHADOS PRONTOS A COMER DE PORTUGAL (SANTOS <i>ET AL.</i> , 2005).	29
TABELA 4 - VALORES GUIA PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS COZINHADOS PRONTOS A COMER DO REINO UNIDO (GILBERT <i>ET AL.</i> , 2000) E DE HONG KONG (KAM <i>ET AL.</i> , 2001).	30
TABELA 5 - VALORES GUIA PARA AVALIAÇÃO DA QUALIDADE MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTOS COZINHADOS PRONTOS A COMER DE AUSTRÁLIA (NSW, 2009).	31
TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO GERAL DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS ANALISADOS DURANTE O PERÍODO DE 2004 A 2010 NO DISTRITO DE AVEIRO.	41
TABELA 7 - CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA DE ALIMENTOS SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DA LEGISLAÇÃO EM CADA GRUPO DE ALIMENTOS.	42
TABELA 8 - AVALIAÇÃO GERAL DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS POR ANOS SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DA LEGISLAÇÃO.	44
TABELA 9 - CLASSIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA GERAL DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS POR PARÂMETRO.	47
TABELA 10 - CLASSIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS POR PARÂMETRO EM LARES.	48
TABELA 11 - CLASSIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS POR PARÂMETRO EM RESTAURANTES.	49
TABELA 12 - CLASSIFICAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS AMOSTRAS DE ALIMENTOS POR PARÂMETRO EM ESCOLAS.	50
TABELA 13 - CLASSIFICAÇÃO DA AMOSTRA DE UTENSÍLIOS SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO DA LEGISLAÇÃO E O SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO EM DUAS CATEGORIAS.	51
TABELA 14 - AVALIAÇÃO GERAL DAS AMOSTRAS DE UTENSÍLIOS POR ANOS SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO LEGISLADA E SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO EM DUAS CATEGORIAS.	52

TABELA 15 - CLASSIFICAÇÃO PELOS PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS DOS UTENSÍLIOS GERAL E PELOS 3 LOCAIS DE PROVENIÊNCIA SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO LEGISLADA.	55
TABELA 16 - CLASSIFICAÇÃO PELOS PARÂMETROS MICROBIOLÓGICOS DOS UTENSÍLIOS PARA TIPOS DE 3 LOCAIS SEGUNDO A CLASSIFICAÇÃO EM DUAS CATEGORIAS.	56

Abreviaturas e siglas

Aw	Atividade da água
CDC	Center for Disease Control
CE	Conformidade Europeia
G	Grama
HACCP	Sistema de identificação de perigos e pontos críticos de controlo
INSA	Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge
ISSO	Organização internacional de normalização
MKTTn	Muller-Kaufmann tetrathionatenovobiocin broth
ml	Mililitro
NACMCF	<i>National Advisory Committee on Microbiological Criterial for Foods</i>
OGY	Oxytetracycline glucose
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	Plate Count agar
PCC	Pontos de Controlo Critico
SPSS	Software Statistical Package for the Social Sciences
SS	<i>Salmonella Shigella</i> agar
TBX	Chromocult agar
Ufc	Unidades formadoras de colónias
VRBL	Vermelho Violeta Bile agar
XLD	Xylose Lysine deoxycholate

1. Introdução

A higiene dos alimentos constitui uma das principais preocupações de saúde pública, pois a vida moderna imprimiu um ritmo acelerado ao quotidiano dos indivíduos, causando mudanças nos hábitos de vida, nomeadamente, nos hábitos alimentares (Jacxsens *et al.*, 2009; Alves & Ueno, 2010). O número de refeições feitas fora de casa tem vindo a aumentar e, conseqüentemente, houve um acréscimo infeções e intoxicações associados ao consumo de alimentos (Sneed & Stronbehn, 2008; Ambrozic *et al.*, 2010; Osimani *et al.*, 2011).

O conceito de segurança alimentar apareceu no início do século XX e veio alargar a autossuficiência alimentar que existia até então, tendo evoluído em grande escala em função das mudanças nos hábitos alimentares das populações (Belik, 2003; Assão *et al.*, 2007; Mendes, 2009).

A segurança alimentar é uma prioridade de saúde pública, visto que milhões de pessoas adoecem todos os anos e muitas morrem como resultado do consumo de alimentos inseguros (Neves, 2005; Sanlier, 2010).

A vigilância microbiológica dos alimentos prontos a comer corresponde a uma área de grande interesse em saúde pública, tendo por objetivo assegurar a inocuidade e a salubridade dos alimentos e atuar na prevenção das doenças de origem alimentar. Por razões relacionadas com a amostragem, metodologia e distribuição dos microrganismos na matriz alimentar, a análise microbiológica, por si só, não garante a segurança de um produto final analisado. A segurança dos produtos alimentares é garantida pela implementação de medidas preventivas, tais como o cumprimento de Boas Práticas de Fabrico e a aplicação do Sistema de Identificação de Perigos e Pontos Críticos de Controlo (HACCP), constituindo as análises microbiológicas uma parte importante do sistema (Santos *et al.*, 2005; Jacxsens *et al.*, 2009).

Na prática é difícil fazer a vigilância sanitária com vista a minimizar os riscos em todos os estabelecimentos de restauração. Deve dar-se prioridade a locais onde já foram observados episódios de doenças alimentares ou aqueles onde se preparam alimentos que são veículos habituais de agentes de toxinfecções alimentares. Os restaurantes, lares

de terceira idade e cantinas escolares são instituições frequentemente implicados na transmissão de doença através do consumo de produtos alimentares (Araújo, 1997).

1.1. Segurança alimentar

1.1.1. Boas práticas de higiene

De acordo com vários investigadores, as toxinfecções alimentares são na sua grande maioria causadas por deficiências de higiene na fase de preparação, processamento, confeção, armazenamento ou distribuição de alimentos (Sneed & Stronbehn, 2008; Veiros *et al.*, 2009; Osimani *et al.*, 2011).

As boas práticas de higiene são o principal ponto de partida da segurança alimentar (Fawzi *et al.*, 2009; Martins, 2011). São um requisito primário essencial de segurança na restauração. Nas boas práticas de higiene são incluídas:

1. regras higiénicas elementares relativamente a cada unidade. Estas regras abrangem vasto de situações que vão desde a higiene pessoal dos membros das equipas que desenvolvem a sua atividade numa unidade até aos princípios elementares de segurança na distribuição (Araújo, 1997; Sneed & Stronbehn, 2008);
2. regras de lavagem e desinfeção de instalações, equipamentos e utensílios. Regras estas que são relativas à lavagem e desinfeção de instalações e equipamentos (Araújo, 1997; Sneed & Stronbehn, 2008).

1.1.1.1. Higiene pessoal

Existem várias fontes de contaminação de alimentos e vários fatores que contribuem para aumentar a probabilidade dessa contaminação (Ferreira, 2006). A higiene do manipulador deve ser muito rígida e é de extrema importância para a inocuidade do produto final (Martins, 2011). As pessoas que de alguma forma contactam com os alimentos nas diversas fases da sua produção, são portadoras de microrganismos que podem contaminar os alimentos e causar doenças a quem os consome (Altekruse *et al.*, 1996; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2010). Estes microrganismos estão presentes, vivem e

desenvolvem-se em diversas partes do corpo (cabelo, nariz, boca, garganta, intestinos, pele, mãos e unhas). Os principais microrganismos patogénicos que podem estar presentes nos manipuladores (corpo e vestuário) e podem passar para os alimentos, causando doença, são: *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Listeria* e vírus. *Staphylococcus aureus* está presente na cavidade nasal de cerca de 70% das pessoas, geralmente sem provocar doença, mas quando transmitido para o alimento pode originar doença (INSA, 2006).

Segundo Araújo (1997), as bactérias *E. coli* e *Salmonella* têm como habitat natural o trato intestinal do homem e dos animais, a sua transmissão ao alimento acontece por causa de más condições de higiene dos manipuladores.

As boas práticas de higiene pessoal englobam um conjunto de regras fundamentais para garantir uma adequada segurança e higiene dos alimentos, tais como: higiene das mãos, vestuário, comportamento pessoal, estado de saúde e situações de doença (Araújo, 1997; Sneed & Stronbehn., 2008).

Na seleção dos manipuladores, os candidatos devem ser questionados sobre o seu estado de saúde, devendo ser-lhes solicitado um comprovativo médico ou ficha de aptidão. Devem efetuar um exame médico completo no início da sua atividade e, pelo menos, uma vez por ano. Este exame médico deve de ser feito por um médico de medicina do trabalho. Sempre que os manipuladores tenham contraído ou suspeitem ter contraído doenças contagiosas ou sofram de doenças de pele, do aparelho digestivo, de inflamações da garganta, ouvidos ou olhos, ficam interditos de todas as atividades diretamente relacionadas com os alimentos até terem comprovação médica que podem retomar à sua atividade (Batista & Venâncio, 2003).

Antes de manipular produtos alimentares ou entrar num local de preparação de alimentos os manipuladores devem retirar todos os objetos, como relógios, brincos, anéis e pulseiras. Não usar verniz nas unhas, colocar vestuário protetor e limpo, cobrir o cabelo por completo com uma touca, lavar bem as mãos e apresentar-se com aspeto asseado (Araújo, 1997).

Sempre que os manipuladores se encontrarem em salas de preparação dos alimentos, devem lavar e desinfetar as mãos com regularidade, cobrir as feridas e cortes

com adesivos impermeáveis e usar luvas. Remover o vestuário protetor quando saírem das instalações. Devem afastar-se dos produtos alimentares e superfícies de trabalho se necessitam de tossir ou espirrar, se precisar usar lenços que sejam descartáveis. Evitar falar quando manipulam alimentos de alto risco, não fumar, tocar na boca, nariz, roer as unhas, comer, beber e mascar pastilha elástica (Ferreira, 2006).

A higienização das mãos é muito importante, se as mãos não forem corretamente higienizadas, os microrganismos, alojam-se em algumas zonas, normalmente, mais descuidadas durante a lavagem (Mitchell *et al.*, 2007; Sneed & Stronbehn, 2008).

Para uma lavagem correta das mãos devem seguir-se as seguintes regras: molhar as mãos e os antebraços com água quente, ensaboar as mãos e antebraços com sabonete líquido desinfetante, lavar cuidadosamente entre os dedos, as costas das mãos, polegar e unhas, passar por água corrente e secar com toalhas de papel descartáveis de utilização única (Baptista & Antunes, 2005; Pereira, 2009).

A lavagem deverá fazer-se sempre que se apresentem sujas e nos seguintes momentos: antes de se iniciar o trabalho, após mudança de roupa, depois do manuseamento de produtos de natureza animal, depois do manuseamento de ovos, antes do manuseamento de alimentos confeccionados, após tossir, espirrar e assoar o nariz, após a utilização das instalações sanitárias, antes e depois de comer, depois de mexer no lixo, mexer em produtos químicos, incluindo os produtos usados para a limpeza (Codex Alimentarius, 2006).

O cabelo deverá apresentar-se curto ou preso (com touca ou boné). A roupa que se utiliza no local onde ocorre a manipulação dos alimentos deve ser exclusiva, adequada às funções, de cor clara, ser descartável (para visitas ou pessoal da manutenção) ou lavável e mantida limpa (Batista & Antunes, 2005).

1.1.1.2. Higiene e segurança das instalações

A segurança alimentar começa na conceção e na construção das instalações, que devem ter em consideração o tipo de alimentos a que se destina, o processamento e a necessidade de se obterem boas condições de higiene (Sneed & Stronbehn, 2008).

Cada estabelecimento tem as suas características, estruturas e dimensões próprias, no entanto, do ponto de vista da higiene e segurança alimentar, todos devem cumprir um conjunto de requisitos mínimos definidos na legislação (regulamento CE nº852/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril).

As instalações devem ser projetadas e construídas tendo em vista o fim a que se destinam, respeitando as seguintes regras essenciais:

- ✓ devem ser dotadas de saneamento e de água potável;
- ✓ todos os compartimentos devem ter iluminação e ventilação apropriadas à sua finalidade;
- ✓ devem ser concebidas de forma a impedir a queda de partículas nos géneros alimentícios e a evitar a acumulação de sujidade, bem como a de condensação e o desenvolvimento de bolores indesejáveis;
- ✓ as operações a que são sujeitos os alimentos, desde que são recebidos no estabelecimento até que chegam ao utente, devem poder ser executadas de forma a impedir a contaminação cruzada, quer por parte dos manipuladores, quer aquando da utilização do equipamento e/ou da sua instalação.

Os locais onde se desenvolvem operações relacionadas com alimentos devem ser mantidos em bom estado de conservação e de limpeza (Araújo, 1997; Ferreira, 2006).

O regulamento CE nº852/2004, no que diz respeito às instalações deve cumprir alguns requisitos, relativamente à sua disposição, construção, localização, dimensões. Este tipo de requisitos é essencialmente para assegurar boas condições de higiene (Gonçalves, 2009; Sneed & Stronbehn, 2008). As instalações devem ter pavimentos, paredes e tetos em bom estado, construídos com matérias resistentes, fáceis de limpar e que não sejam absorventes. O pavimento deve ser antiderrapante e é aconselhável que tenha um declive de forma a facilitar o escoamento de água, de forma a evitar contaminações. As paredes e tetos devem ser pintados com tinta adequada (Garrelha, 2008). As portas, devem ser laváveis e de fácil limpeza, pois estas são uma fonte importante de contaminação. As janelas ou claraboias devem possuir um sistema que impeça a entrada de animais. Recomenda-se que estas se mantenham fechadas pois podem ocasionar contaminações durante a confeção e manuseamento de alimentos

(Pereira, 2009). As instalações devem possuir um sistema de ventilação, que renove constantemente o ar e extraia os fumos e cheiros. Estes devem ser limpos periodicamente (Gonçalves, 2009). A iluminação é importante que seja suficiente, poderá ser natural ou artificial, desde que estejam protegidas de um provável acidente e estilhacem os vidros para cima dos alimentos (Garrelha, 2008). As bancadas e equipamentos devem ser de materiais lisos, laváveis, não tóxicos, pois estas vão estar diretamente em contacto com os alimentos (Pereira, 2009).

Deve existir uma zona de vestiários equipados com cacifos, para que os trabalhadores tenham um local para colocar os seus objetos pessoais. Deve existir também instalações sanitárias, separadas por sexo e concebidas de acordo com o número de trabalhadores. Devem estar equipadas com todas as peças sanitárias, materiais para a limpeza e secagem higiénica (regulamento CE nº852/2004).

A limpeza e a desinfeção das instalações e dos equipamentos são operações extremamente importantes na indústria alimentar. As operações de limpeza e desinfeção, têm por finalidade assegurar que nos locais onde se manipulam, preparam e confeccionam alimentos não existem microrganismos, ou que, se existirem, seja na menor quantidade possível. A limpeza remove a sujidade, restos de alimentos, gorduras ou outro tipo de detritos. A desinfeção elimina microrganismos que resistem frequentemente à limpeza. Uma boa limpeza deve compreender uma fase para eliminar a sujidade encrostada, uma lavagem com água morna, adicionada de um detergente, e o enxaguamento com água quente.

A desinfeção, deve ser feita com alguma regularidade, deve ser feita sempre após a limpeza, com enxaguamento de seguida, exceto se as instruções do fabricante o indicarem (Codex Alimentarius, 2006).

1.2. Implementação e gestão de sistemas de segurança (HACCP)

Todos os que intervêm numa linha de produção alimentar são responsáveis por assegurar a qualidade e segurança dos produtos alimentares (Jorge, 2008).

Os sistemas de segurança alimentar devem implementar planos de HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*). Este é um sistema preventivo de controlo de

segurança alimentar, que identifica os perigos específicos e as medidas preventivas para o seu controlo em todas as etapas de produção. Baseia-se numa abordagem sistemática, documentada e variável (Figueiredo & Neto, 2001).

A sua aplicação baseia-se em princípios técnicos e científicos, definidos através de uma reflexão sobre diversas questões como: O que é o produto? Que perigos estão associados ao processo? Em que etapas do processo podem correr? Qual a probabilidade destes perigos constituírem um risco para os consumidores?

Para que a aplicação do HACCP seja bem sucedida é necessário o total compromisso e empenho da administração, bem como de todos os colaboradores. Este sistema deve basear-se na realidade de cada empresa e não na adaptação de planos de outras empresas (Araújo, 1997; FQA, 2002).

1.2.1. Origem do sistema HACCP

A aplicação do HACCP à produção alimentar aconteceu em meados dos anos 60 no século XX, devido à necessidade da *Administração Nacional da Aeronáutica e do Espaço* (NASA) garantir alimentos seguros aos astronautas do programa espacial. A aplicação do sistema no programa espacial americano resultou na obtenção de alimentos 100% seguros relativamente a agentes bacterianos e virais, toxinas, e ainda perigos químicos e físicos. O HACCP substituiu o habitual método de controlo de segurança alimentar que consistia no teste ao produto final, e providenciou um sistema preventivo para produção de alimentos seguros, de aplicação universal (Araújo, 1997).

Nos anos subsequentes, o sistema HACCP foi reconhecido como um sistema efetivo de controlo. Adotado de forma quase universal em vários países do mundo. Tem sido sistematicamente aplicado à indústria alimentar e aos locais com serviço de refeições (Figueiredo & Neto, 2001).

1.2.2. Vantagens do sistema HACCP

O sistema HACCP enfatiza o papel da indústria e dos operadores de alimentos na prevenção e resolução dos problemas, num processo que se pretende realizado de modo contínuo, apresentando vantagens em relação às inspeções convencionais (FQA, 2002;

Sneed & Stronbehn, 2008). Este sistema identifica claramente o estabelecimento alimentar como um elemento da cadeia responsável por assegurar a segurança dos alimentos que produz. Este sistema implica que o operador analise os seus métodos de preparação de forma racional e científica, de modo a identificar os pontos de controlo críticos (PCC) e a estabelecer limites críticos e procedimentos de monitorização. Um aspeto essencial da responsabilidade do operador é a obrigatoriedade de manter registos que documentem o respeito pelos limites críticos estabelecidos para os vários PCC, o que resulta numa contínua autoavaliação (FQA, 2002). Por outro lado, o sistema HACCP permite a uma entidade auditora determinar mais percetivelmente o nível de envolvimento do operador, já que é pelo acesso aos registos de monitorização dos PCC que se verifica como é que o plano HACCP está a funcionar.

Antes da implementação do sistema HACCP, a entidade auditora apenas podia determinar as condições e as práticas do estabelecimento no momento da inspeção. Estando implementado um sistema HACCP, tanto as condições presentes como as passadas podem ser analisadas. A consulta aos registos do HACCP permite efetivamente recuar no tempo e obter uma visão mais abrangente de todo o processo. As inspeções tradicionais são relativamente ineficientes e são mais reativas do que preventivas, comparadas com a abordagem HACCP, no assegurar a segurança alimentar (FQA, 2002).

1.2.3. Os princípios do HACCP

Em 1992, o National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods (NACMCF) definiu sete princípios a ser considerados quando se desenvolve um plano HACCP. Em 1997, o grupo de trabalho para o HACCP da NACMCF reviu o documento comparou-o com o corrente guia de HACCP elaborado pelo Codex Committee on Food Hygiene. Em resultado desta revisão, o HACCP foi definido como uma abordagem sistemática à identificação, avaliação e controlo dos perigos dos alimentos, que consiste em sete princípios:

1. efetuar uma análise dos perigos, preparar um fluxograma com todas as etapas do processo, identificar e listar perigos potenciais e especificar medidas preventivas para o seu controlo;

2. identificar os pontos críticos de controlo (PCC), na fase em que o controlo é essencial para evitar ou eliminar um risco ou reduzir para níveis aceitáveis;
3. estabelecer os limites críticos que devem ser respeitados para garantir que cada PCC está sob controlo;
4. estabelecer um sistema de vigilância do controlo dos PCC através de observações e/ou testes periódicos programados;
5. estabelecer as ações corretivas a serem tomadas quando o sistema indicar que um PCC está fora de controlo;
6. organizar a documentação respeitante a todos os procedimentos e registos relativos a estes princípios e à sua aplicação;
7. estabelecer os procedimentos de verificação que incluam ensaios suplementares apropriados e procedimentos que em conjunto com uma revisão do plano HACCP, confirmem que o plano está a funcionar (FQA, 2002; Jacksens *et al.*, 2009).

A aplicação destes princípios é conseguida em várias etapas, que devem ser seguidas numa sequência lógica, aquando do desenvolvimento de um plano HACCP.

1.2.4. Implementação do HACCP

Das etapas da implementação do sistema HACCP estão diretamente relacionadas com os sete princípios deste sistema, aos quais se adicionam outros cinco, preliminares, que correspondem à estruturação da equipa que vai desenvolver o estudo e planeamento do HACCP e à compilação de informação de suporte relevante para a realização da análise de perigos (Batista & Antunes, 2005).

1ª Etapa – Definir âmbito do plano HACCP

Definir claramente o âmbito de aplicação, decidir qual o processo, o produto e os tipos de perigos que se vão considerar (Araújo, 1997).

2ª Etapa – Formação da equipa de HACCP

A primeira atividade é formar uma equipa que deve ser multidisciplinar, incluindo pessoas com responsabilidades, conhecimentos e experiência específica relativamente ao produto e processos utilizados da empresa (Cerf & Donnat, 2011).

3ª Etapa – Descrição e caracterização do produto

A equipa HACCP deve fazer uma descrição completa do produto, incluindo informações de segurança relevantes como a composição, características físicas ou químicas, processamento, conservação e acondicionamento, condições de armazenagem, método de distribuição e durabilidade. Tudo que pode afetar a segurança do produto final (Codex Alimentarius, 2006).

4ª Etapa – Identificação da utilização prevista do produto

A equipa deve saber identificar claramente qual o público-alvo do produto e saber se faz parte de um segmento particular da população. Por exemplo grupos mais vulneráveis da população, como crianças e idosos (Araújo, 1997).

5ª e 6ª Etapa – Elaboração de fluxograma e sua verificação no terreno

A equipa HACCP é responsável pela elaboração de fluxogramas detalhados para os diferentes processos, de modo a cobrir todos os passos da operação. Num restaurante ou local semelhante, isto implica um fluxograma diferente para cada tipo de produto final (prato) confeccionado. No entanto, em alternativa, pode-se elaborar um fluxograma sumário desde que contemple todos os processos existentes e todas as etapas a ter lugar (Batista & Antunes, 2005).

7ª Etapa – Identificação e análise de perigos a cada etapa (Princípio 1)

A análise de perigos é um elemento chave para o plano HACCP. A análise dos perigos consiste em identificar aqueles cuja eliminação ou redução para níveis aceitáveis é essencial para a produção de um alimento seguro. Depois de se identificarem os perigos, deve-se considerar que medidas preventivas, se existirem, podem ser aplicadas a cada perigo, sendo uma medida preventiva qualquer passo ou fator que pode ser usado para controlar um perigo identificado (FQA, 2002).

Durante a identificação dos potenciais perigos, importa distinguir aqueles que são significativos dos que não são significativos em termos de grau de risco (Batista & Antunes, 2005).

8ª Etapa – Identificação dos pontos críticos de controlo (PCC) (Princípio 2)

A determinação de um PCC constitui uma etapa, passo ou procedimento do processo de fabrico do alimento, onde se pode exercer controlo com o objetivo de prevenir, eliminar ou reduzir um perigo significativo para níveis aceitáveis (Cerf & Donnat, 2011).

Frequentemente pode ser utilizada uma “árvore de decisão”. Esta é uma ferramenta constituída por uma sequência de questões estruturadas, aplicada a cada passo do processo, permitindo determinar se um dado ponto de controlo, nessa fase do processo, constitui verdadeiramente um PCC, sendo que apenas os perigos considerados significativos são levados à “árvore de decisão” (Batista & Antunes, 2005).

9ª Etapa – Estabelecimento de limites críticos de controlo (Princípio 3)

Uma vez identificados os PCC, deve definir-se quais os limites que garantem a segurança dos alimentos, ou seja, limites críticos de controlo. Estes limites devem ser estabelecidos para cada parâmetro associado a um PCC, devendo respeitar as exigências estabelecidas legalmente e estar em conformidade com o conhecimento técnico-científico existente (Batista & Antunes, 2005).

Os critérios mais utilizados incluem medição de temperatura, tempo de confeção, pH e parâmetros sensoriais como a aparência visual e textura (FQA, 2002).

10ª Etapa – Estabelecimento de um sistema de monitorização para cada PCC (Princípio 4)

A monitorização é uma sequência planeada de observações ou medidas que permitem verificar se um PCC está sob controlo, ou a observação e medição programada de um PCC, tendo em conta os seus limites críticos (Batista & Antunes, 2005).

Esta monitorização deve estar aptos a detetar uma potencial perda de controlo do PCC e realizar os ajustes necessários ao processo e determinar medidas corretivas quando tal for necessário. A frequência da monitorização deve ser suficiente para garantir que o PCC está sob controlo (Cerf & Donnat, 2011).

11ª Etapa – Estabelecimento de ações corretivas (Princípio 5)

As ações corretivas são medidas específicas definidas para cada PCC que devem ser tomadas quando ocorrem desvios, de modo a assegurar que o PCC é mantido sob

controle. Estas ações devem ser documentadas nos registos do HACCP (Figueiredo & Neto, 2001).

12ª Etapa – Estabelecimento de procedimentos de verificação (Princípio 6)

Uma vez completo o plano de controle do HACCP e definidos todos os PCC no fluxograma, completou-se o plano HACCP. No entanto são necessários métodos de verificação e auditorias, incluindo testagem de amostras aleatórias e análises, para determinar a eficácia do sistema HACCP. A frequência de verificação deve ser suficiente para confirmar que o sistema HACCP está a funcionar efetivamente. As atividades de verificação incluem a consulta do sistema HACCP e seus registos, revisão de desvios e confirmação de que os PCC se encontram sob controle (Batista & Antunes, 2005).

13ª Etapa – Estabelecer sistemas de registo e arquivo de dados (Princípio 7)

Sendo um sistema dependente da documentação, é essencial a manutenção de registos eficazes e rigorosos é essencial para a aplicação do sistema HACCP. A documentação e os registos devem ser apropriados à natureza e dimensão da operação. A necessidade de registar os procedimentos numa base regular assegura que está a ocorrer uma monitorização preventiva e permite que quaisquer ocorrências incomuns descobertas durante a monitorização sejam imediatamente registadas e corrigidas (Codex Alimentarius, 2006).

14ª Etapa – Revisão do plano HACCP

Deve ser feita sempre após a implementação inicial do sistema (Figueiredo & Neto, 2001).

1.3. Deterioração e contaminação dos alimentos

As doenças transmitidas por alimentos resultam da ingestão de alimentos que possam estar contaminados com microrganismos patogénicos, substâncias químicas, objetos lesivos ou que contenham na sua constituição estruturas naturalmente tóxicas (Heritage *et al*, 1999; Isara *et al.*, 2010).

1.3.1. Perigos físicos

As maiorias das queixas em restaurantes estão relacionadas com perigos físicos (Loureiro, 2009). Qualquer objeto estranho a um alimento e que se incorpore acidentalmente no mesmo provoca a contaminação física desse alimento. Por exemplo, a presença de um pedaço de uma embalagem, um cabelo, um bocado de palha de aço, metais, lâminas de facas, vidros provenientes de garrafas, loiça, fragmentos de madeira (com origem caixas de madeira ou no ambiente), pedras e fragmentos de metal (provenientes dos campos de produção ou dos edifícios), fragmentos de osso, e mesmo outros objetos como joias e adereços provenientes dos manipuladores na loiça ou na comida. Estes perigos podem causar danos onde se incluem cortes, sangramento, quebra de dentes. Se progredirem no trato gastrointestinal, alguns destes perigos poderão causar efeitos graves, requerendo mesmo meios invasivos, como a cirurgia, para serem removidos (Neves, 2005; Guedes, 2006).

Os pré-requisitos numa cozinha deverão prevenir contaminação dos alimentos, por perigos físicos. A prevenção destes perigos nas matérias-primas assenta, sobretudo, nos sistemas de controlo de segurança alimentar utilizados nas operações de abastecimentos, ou seja nos processos que envolvem os fornecedores (Neves, 2005; Garrelha, 2008).

1.3.2. Perigos químicos

Alguns resíduos químicos podem ser detetados nos alimentos e nos locais de trabalho (Araújo, 1997). Os resíduos presentes nas matérias-primas não são possíveis de serem removidos da cadeia alimentar, pelo que o seu controle assenta sobretudo, em programas de controlo na produção primária e/ou fases de processamento anteriores ao fornecimento (Guedes, 2006; Abreu *et al.*, 2010).

Existem, no entanto, alguns perigos químicos que podem estar associados a alguns alimentos, como seja a presença de resíduos de antibióticos em produtos de origem animal, ou resíduos de pesticidas em vegetais, cuja detecção é impossível nos estabelecimentos. Nestes casos os responsáveis dos estabelecimentos devem solicitar certificados de conformidade, aos seus fornecedores, garantindo que a utilização de produtos químicos na produção de carne, fruta e vegetais, foi correta, em concordância

com os regulamentos. Os resíduos provenientes do material de embalagem podem ser evitados, exigindo que os fornecedores utilizem materiais recomendados e verificando no ato da receção que as embalagens ou contentores se encontram em boas condições. A contaminação dos alimentos por resíduos dos produtos de limpeza e desinfecção usados na cozinha são prevenidos, através do armazenamento e métodos de aplicação adequados, estes processos são controlados no âmbito dos pré-requisitos (Neves, 2005; Garrelha, 2008).

Nos últimos anos, tem-se verificado um aumento constante de graves reações a alimentos alérgicos como, por exemplo, amendoins e outros frutos secos (Loureiro, 2009). Cada estabelecimento deve estar atento à provável presença de substâncias alérgicas nas matérias-primas e estas devem ser armazenadas, preparadas e expostas em áreas separadas, de modo a prevenir a contaminação cruzada. Os clientes devem ser informados da provável presença de vestígios, destas substâncias (Araújo, 1997; Neves, 2005).

1.3.3. Perigos biológicos

Entre os três tipos de perigos, o microbiológico é o que representa maior risco para a segurança dos alimentos. Estima-se que cerca de 90% das doenças transmitidas por alimentos sejam provocadas por microrganismos (Balbani & Butugan, 2001).

Alguns microrganismos causam deterioração de alimentos, tornando-os impróprios para consumo humano, outros são patogénicos e podem causar doenças ou danos nos seres humanos (Araújo, 1997).

Os perigos biológicos de origem alimentar incluem microrganismos como bactérias, vírus, protozoários e fungos e ainda toxinas por eles produzidas. Estes microrganismos estão frequentemente associados a manipuladores e produtos crus contaminados. Muitos deles encontram-se no ambiente onde os alimentos são produzidos. Vários, são inativados pela cozedura, e a sua presença pode ser evitada através do uso de práticas adequadas na manipulação e armazenamento dos alimentos (Abreu *et al.*, 2010).

Embora se conheçam mais de 250 tipos microrganismos causadores de doença de origem alimentar apenas alguns aparecem frequentemente. Para se caracterizar cada

perigo é necessário conhecer a sua origem, ecologia e virulência. Os microrganismos são classificados em três grupos, de acordo com a sua severidade para a saúde do ser humano (Veiga *et al.*, 2009).

- **risco moderado, disseminação limitada (ou baixa)**, causa comum de surtos, disseminação posterior rara ou limitada, causa doença quando os alimentos ingeridos contêm uma grande quantidade de patogénicos;
- **risco moderado, disseminação potencial extensa**, a patogenicidade é menor, o grau de contaminação é menor e há contaminação cruzada, os efeitos podem ser revertidos por atendimento médico e podem incluir hospitalização;
- **risco severo**, efeitos graves para a saúde, inclusive morte.

De acordo com o *National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Food* (N.A.C.M.C.F.), estes microrganismos podem ser classificadas segundo o seu perigo e disseminação (Tabela 1) (Veiga, 2009).

Tabela 1 - Classificação dos microrganismos de acordo com o seu risco e disseminação segundo o *National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Food* (Veiga, 2009).

Risco moderado/ disseminação limitada (ou baixa)	Risco moderado/ disseminação potencial extensa	Risco severo
<i>Bacillus cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Clostridium botulinum</i> (A, B, E, F)
<i>Campylobacter jejuni</i>	<i>Salmonella</i> spp.	<i>Shigella dysenteriae</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	<i>Shigella</i> spp.	<i>Salmonella typhi</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica	<i>Salmonella paratyphi</i> A, B
<i>Vibrio cholera</i> non-01	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Vírus das hepatites A e E
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Rotavírus	<i>Brucella abortus</i>
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Vírus Norwalk	<i>Brucella suis</i>
<i>Giardia lamblia</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Vibrio cholerae</i> 01
<i>Taenia saginata</i>	<i>Diphyllobothrium latum</i>	<i>Vibrio vulnificus</i>
	<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Taenia solium</i>

1.4. Fatores que favorecem a deterioração de alimentos por microrganismos

Todos os seres vivos, incluindo os microrganismos, necessitam de nutrientes, água, de uma determinada temperatura e de tempo para se desenvolverem. Existem também outros fatores que têm influência no seu desenvolvimento, como a acidez do meio, humidade e a quantidade de oxigénio (Garrelha, 2008).

A temperatura é um dos fatores que mais afeta o crescimento dos microrganismos. Os microrganismos responsáveis pela maior parte das toxinfecções alimentares são mesófilos desenvolvendo-se entre os 5°C e os 65°C. A temperatura mais propícia ao desenvolvimento é, no entanto, de 37°C. Em função da temperatura as bactérias são designadas por psicrófilas, mesófilas e termófilas. As primeiras desenvolvem-se entre 0 a 20°C, as bactérias mesófilas tem temperaturas ótimas de desenvolvimento entre os 20 e 45°C, por exemplo, o género *Salmonella* e o *Clostridium perfringens*. As bactérias termófilas têm uma temperatura ótima de desenvolvimento superior a 45°C, é o caso da *Campylobacter spp.* Para impedir o desenvolvimento microbiano, os alimentos devem ser mantidos a temperaturas inferiores a 5°C ou superiores a 65°C (Araújo, 1997).

A água é um dos fatores mais importantes para o desenvolvimento dos seres vivos, o mesmo ocorre com os microrganismos. Estes não crescem nem se multiplicam na ausência de água, caso dos alimentos desidratados. Porém também não morrem nestes alimentos. Quando estes alimentos são reconstituídos, os microrganismos voltam a crescer e a multiplicar-se, pelo que se deve ter com estes alimentos os mesmos cuidados que se têm com os alimentos frescos (Garrelha, 2008).

Noutros alimentos, caso dos alimentos congelados, a água, embora esteja presente, não está disponível para os microrganismos. Nestes casos faz mais sentido falar na atividade da água (a_w), que corresponde à quantidade de água disponível num determinado alimento. A atividade da água varia entre 0 e 1. A maioria das bactérias que deteoram alimentos tem necessidade de uma a_w mínimo de 0,9, enquanto as leveduras necessita de a_w 0,86 e os bolores 0,80. O *Staphylococcus aureus* consegue crescer a valores de a_w , de 0,86. Os bolores e leveduras são mais tolerantes a valores baixos de a_w ,

alterando assim mais facilmente os alimentos de $a_w < 0,85$ como a farinha, peixe salgado ou geleias muito doces do que as bactérias (Araújo, 1997).

A maior parte dos microrganismos desenvolvem-se melhor a valores de pH entre 6 e 8 (Araújo, 1997). Assim a acidez dos alimentos contribui para reduzir a capacidade de desenvolvimento dos microrganismos. Os microrganismos podem desenvolverem-se numa ampla faixa de valores de pH, entre 2,5 a 9,5 (Baptista & Antunes, 2005). Em geral, as leveduras e os bolores podem crescer numa gama mais alargada de pH (1,6 a 9,3). Estes desenvolvem-se bem em meios mais ácidos, o pH óptimo para as leveduras é de 4 a 6,5 e para os bolores é de 4,5 a 6,8. As frutas e legumes são alimentos ácidos e, consequentemente as leveduras e os bolores desenvolvem-se mais rapidamente que as bactérias. As bactérias crescem melhor a pH entre 6,5 a 7,5. Os alimentos ricos em proteínas (carne, ovos, leite, etc.) são menos ácidos, nestes produtos as bactérias tendem a dominar (Lacasse, 1995).

O teor de oxigénio é um fator que afecta muito o crescimento dos microrganismos. Existem microrganismos que necessitam de oxigénio para se desenvolverem, estes designam-se por aeróbios, necessitam de substratos oxidados com valores positivos de oxi-redução para se desenvolverem. Os microrganismos anaeróbios não necessitam de oxigénio, crescendo apenas na sua ausência. Os anaeróbios facultativos podem desenvolver-se sob condições aeróbias ou anaeróbias em substratos oxidados ou reduzidos (Araújo, 1997). O crescimento dos microrganismos aeróbios está restrito muitas vezes à zona superficial do alimento, onde o oxigénio do ar está disponível, a menos que seja uma estrutura porosa ou com aberturas naturais. Os alimentos mais contaminados por estes microrganismos são os ovos, sumos de fruta, leite, carne picada, farinhas, frutas e legumes. O crescimento dos microrganismos anaeróbios acontece no interior do alimento onde não há penetração do ar, por exemplo, carnes em lata, charcutaria cozinhada, carne crua, fígado cru, batatas, cereais em grão (Lacasse, 1995).

A disponibilidade de nutrientes é um fator importante para os microrganismos, já que a sua ausência ou baixa concentração limita o seu desenvolvimento. A grande parte dos microrganismos desenvolve-se sobre um alimento, encontrando aí um conjunto de nutrientes necessários ao seu crescimento. Por exemplo, no caso dos hidratos de carbono

simples e os aminoácidos, que entram na composição de muitos alimentos, são largamente utilizados pelos microrganismos como fonte de carbono e energia. Contudo, alguns microrganismos têm requisitos específicos no que respeita aos nutrientes. *Pseudomonas* só sintetizam proteínas a partir de fontes muito simples como os aminoácidos e nitratos, enquanto, *S. aureus* sintetiza apenas parte das vitaminas que necessita. *E. coli* sintetiza todas as vitaminas que necessita (Araújo, 1997).

1.5. Doenças associadas ao consumo de alimentos

A designação “doenças de origem alimentar” é vulgar e tradicionalmente utilizada para definir um quadro sintomatológico. Estas doenças continuam a ser responsáveis por elevados níveis de mortalidade e morbilidade na população em geral, especialmente nos grupos de risco, como as crianças, idosos e imunodeprimidos (Pinto, 1996).

Segundo o CDC “Center for Disease Control” nos Estados Unidos, uma doença transmitida por alimentos é definida como um “incidente em que duas ou mais pessoas apresentam os mesmos sintomas de doença, após ingestão de alimento, e as análises epidemiológicas apontem o alimento como a origem da doença” (Batista & Antunes, 2005). O quadro sintomatológico é caracterizado por um conjunto de perturbações gástricas, envolvendo geralmente vômitos, diarreias, febres, dores abdominais que podem ocorrer individualmente ou em combinação (Eley, 1996).

Estas doenças são frequentemente denominadas por infeções ou intoxicação alimentares. A infeção alimentar ocorre quando os microrganismos presentes no alimento passam para o organismo humano por ingestão, onde se multiplicam, causando danos internos e provocando inevitavelmente uma doença. Os microrganismos entram no organismo através do trato gastrointestinal e geralmente causam os primeiros sintomas náusea, vômito, cólica abdominal e diarreia. Destacam-se entre estes microrganismos a *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (Araújo, 1997; Loureiro, 2009; Isara *et al.*, 2010).

A intoxicação alimentar ocorre quando os microrganismos presentes no alimento produzem toxinas que são ingeridas pelos consumidores, causando intoxicação. Neste caso, não são os microrganismos que causam toxinfecção alimentar mais sim a toxina por

eles produzida. Manifesta-se algumas horas após a ingestão dos alimentos contaminados e os sintomas podem ocorrer durante 1 a 7 dias. Os sintomas dependem dos microrganismos e da quantidade de alimentos ingerido, os mais frequentes são dor abdominal, diarreia, vômitos, em alguns casos, febre e dor de cabeça (Garrelha, 2008; Loureiro, 2009; Isara *et al.*, 2010). Podem ser provocadas por diversos grupos de microrganismos, incluindo bactérias e bolores. De entre as bactérias que produzem toxinas pode referir-se o *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (Guedes, 2006) e de entre os fungos o *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium* (Lacasse, 1995).

As bactérias, pela sua diversidade e patogenia, constituem o grupo microbiano mais importante e o mais associado às doenças transmitidas pelos alimentos. Embora em menor escala, os bolores são também responsáveis por doenças alimentares, devido à sua capacidade de produzir toxinas, associada muitas vezes, às más condições de conservação (Lacasse, 1995). Os vírus têm sido mais associadas a surtos devido ao consumo de bivalves contaminados (Burri & Vale, 2006). Os protozoários têm sido mais implicados em doenças transmitidas por saladas contaminadas (Vaerewijck *et al.*, 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), nos Estados Unidos da América onde os alimentos são considerado os mais seguros do Mundo, por ano cerca de 76 milhões de casos de doenças alimentares resultam em 325000 internações e 5000 mortes (Newell *et al.*, 2010). Num estudo envolvendo 14 milhões de pacientes nos Estados Unidos verificou-se, através de exames laboratoriais, que a causa da doença foi a presença de agentes patogénicos, tendo ocorrido 60.000 de hospitalizações e 1800 mortes (Scarcelli & Piatti, 2002). Em que em Espanha entre 2004 e 2007, 54,7% dos surtos alimentares, entre 2004 e 2007 foram transmitidos por alimentos prontos a servir (Garayoa *et al.*, 2011).

A detecção destes agentes patogénicos em alimentos é uma grande preocupação para indústria alimentar. Por outro lado, a ocorrência de microrganismos patogénicos emergentes como *E. coli* O157:H7, *Campylobacter*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes*; *Vibrio cholerae* O1; *Vibrio parahaemolyticus*; *Vibrio vulnificus*; *Yersinia*

enterocolitica; *Cryptosporidium spp* e *Cyclospora spp*, é cada vez maior (Leite & Waissamann, 2006).

O fenómeno da reemergência, é também um problema actual. É o exemplo caso da salmonelose, reportada há décadas como doença infecciosa e considerada emergente pelo aumento da sua incidência em muitos países nos últimos 25 anos, normalmente associado ao consumo de ovos e aves (Santos *et al.*, 2007).

Em Portugal, os resultados obtidos entre 2004 e 2006, pelos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos de Lisboa e do Porto do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), mostraram que os agentes etiológicos mais implicados em toxinfecções alimentares são *Salmonella*, *Clostridium* e *Staphylococcus aureus* (Tabela 2) (Santos *et al.*, 2007).

Tabela 2 - Dados relativos aos agentes etiológicos responsáveis por toxinfecções alimentares isolados entre 2004 e 2006 nos Laboratórios de Microbiologia de Alimentos (Lisboa e Porto) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA).

Toxinfecções Alimentares entre 2004 e 2006	
Agente etiológico	Nº de Surtos
<i>Salmonella enteritidis</i>	18
<i>Clostridium botulinum</i> Tipo B	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	6
<i>Clostridium perfringens</i>	3
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3
<i>Bacillus cereus</i>	2
<i>E. coli</i> ETEC	1
<i>E. coli</i> VTEC + <i>E. coli</i> ETEC	1
<i>S. enteritidis</i> + <i>E. coli</i> VTEC	1
<i>S. enteritidis</i> + <i>S. aureus</i>	1
<i>S. enteritidis</i> + <i>S. powell</i> + <i>S. aureus</i>	1
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> EAEC	1
<i>S. aureus</i> + <i>B. cereus</i>	1
<i>Clostridium perfringens</i> + <i>Bacillus cereus</i>	1
Total	51

ETEC - Enteropatogénica

VTEC - Enterotoxinogénica

Entre 2003 e 2006 foi detectado pelo INSA, *Listeria monocytogenes* em vários alimentos servidos, nomeadamente, em saladas de fruta, saladas, bolos e doces, alimentos mistos, alimentos cozinhados e produtos pré-cozinhados. Dados do mesmo laboratório mostraram que em 2005 e 2006, foi isolada *E. coli* em 76 amostras de alimentos prontos a comer. Foi também detectada *E. coli* em 26 esfregaços de utensílios higienizados (Santos *et al.*, 2007).

Felizmente, são cada vez menos casos de doenças de origem microbiana transmitidas por ingestão de alimentos contaminados. Esta melhoria acontece pelo facto de existir

uma utilização de programas de controlo de qualidade microbiológica cada vez mais eficazes e cada vez mais seguros do ponto de vista de saúde pública (Batista & Antunes, 2005). No programa de controlo de qualidade microbiológica é feita a análise de microrganismos patogénicos e microrganismos indicadores. A escolha dos microrganismos indicadores permitem realizar a monitorização dos potenciais perigos microbianos. A sua presença pode indicar uma fonte de patogenicidade (por exemplo, material fecal), estes não se multiplicarem no meio ambiente e são fáceis de isolar, identificar e enumerar. A ausência de microrganismos indicadores, no entanto, não garante segurança, uma vez que alguns patogénicos são mais resistentes ao tratamento que os indicadores.

1.6. Microrganismos indicadores e patogénicos usados na avaliação da qualidade microbiológica de alimentos

1.6.1. Microrganismos indicadores

1.6.1.1. Aeróbios mesófilos

Os microrganismos aeróbios mesófilos apresentam crescimento óptimo entre 20°C a 45°C. A sua contagem fornece uma estimativa da contaminação microbiana total. Altas contagens usualmente estão relacionadas com a baixa qualidade da matéria prima e podem indicar que existem condições favoráveis para o desenvolvimento de microrganismos patogénicos (Lacasse, 1995). A deteção e enumeração deste grupo de bactérias é usada tanto para controle da qualidade como para controle de eficiência das práticas de higiene de equipamentos e utensílios durante a produção.

Noventa por cento dos utensílios usados no refeitório de uma escola brasileira estavam contaminados com mesófilos aeróbios (Pinheiro *et al.*, 2010).

1.6.1.2. Bolores e Leveduras

Do ponto de vista sanitário, a presença de bolores e leveduras nos alimentos é habitualmente considerado como inofensivo, mas os bolores que produzem micotoxinas

podem provocar intoxicações alimentares. As espécies de bolores toxigénicas pertencem a três géneros principais: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*. Estas toxinas em doses elevadas, podem ser mortais. Geralmente atingem o fígado, provocando lesões neste órgão, podendo também causar cancro nos rins, estômago, esófago e cólon. Podem ainda provocar hemorragias, perturbações neurológicas e cardíacas, abortos e sarcomas de pele (Eley, 1996).

A pesquisa de bolores e leveduras nos alimentos serve de indicador, podendo indicar má manipulação e também exposição ao ar (Ferreira & Sousa, 2000).

Aspergillus flavus produz as aflatoxinas, que em termos de microbiologia alimentar, são as mais importantes pois representam um maior perigo potencial para a saúde humana. Em doses fortes, as aflatoxinas são venenos mortais, no entanto, em doses muito pequenas são igualmente nocivas se forem absorvidas regularmente. Este fungo está extremamente disseminado no meio ambiente, a nível mundial, sendo o vento o veículo habitual de transporte dos seus esporos, que, conseqüentemente, contaminam os alimentos. Os cereais (milho), os grãos oleaginosos (amendoins e nozes) e as leguminosas (grãos de soja) são substratos propícios para o crescimento deste fungo especialmente quando armazenados durante alguns dias a temperaturas próximas dos 25°C e humidade superior a 70% (Lacasse, 1995).

1.6.1.3. Coliformes totais e *Escherichia coli*

Estas bactérias são da família *Enterobacteriaceae*, são capazes de fermentar a lactose com produção de ácido e de gás, quando incubados a 35-37°C (coliformes) ou a 45°C (*E. coli*) por 48 horas. São bactérias gram-negativas não formadoras de esporos. Fazem parte desse grupo predominantemente bactérias pertencentes aos géneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*. Destas apenas a *Escherichia coli* tem como hábitat primário o trato intestinal do Homem e animais. Os demais *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Klebsiella*, além de serem encontrados nas fezes, também estão presentes em outros ambientes como na vegetação e no solo, onde persistem por tempo superior ao das bactérias patogénicas de origem intestinal (Pinto, 1996). Conseqüentemente, a presença de coliformes totais no alimento não indica, necessariamente, contaminação fecal ou

ocorrência de enteropatógenos. Indicam contaminação durante o processo de fabricação ou mesmo contaminação pós-processamento (Mogharbel & Masson, 2005). Os alimentos mais frequentemente associados a infecções por *E. coli* são as carnes mal cozinhadas, enchidos, alface, sumos de fruta, queijo e leite cru (Araújo, 1997). Esta bactéria causa, frequentemente, diarreia (muitas vezes sanguinolentas) e cólicas abdominais (muitas vezes agudas). O seu período de incubação pode variar entre 1 a 10 dias mas, normalmente, varia entre 3 e 4 dias (Ferreira *et al.*, 2010).

A presença de *E. coli* num alimento pode indicar contaminação de origem fecal (Pinto, 1996). Alimentos pouco ácidos que permanecem a uma temperatura favorável, quando incubadas a 44 a 45°C podem permitir o crescimento rápido desta bactéria. Esta bactéria é muito sensível, contudo, à pasteurização, e quando este processo é bem realizado é suficiente para a destruir (Mogharbel & Masson, 2005).

Ao longo dos anos têm ocorrido vários surtos causados por esta bactéria. Em 1982 ocorreu um grande surto de diarreia sangrenta grave na América do Norte. Esses surtos aumentaram nos anos seguintes de tal forma que nos Estados Unidos, provocou doença em 73.000 pessoas causando 250 mortes. O primeiro surto conhecido na Europa foi em 1985, na Inglaterra, no qual ocorreram 33% de surtos. Nos últimos 20 anos também ocorreram outros surtos, por exemplo em 2005, numa escola no sul de Gales, observaram-se 157 casos de infecção (Newell *et al.*, 2010).

1.6.2. Microrganismos patogénicos

1.6.2.1. *Salmonella*

Este género é constituído por bastonetes gram negativos aeróbios e anaeróbios facultativos, com 0,5 a 0,7 por 1 a 3 micrómetros, móveis por um flagelo peritríquio, não esporulados. O principal reservatório desta bactéria é o intestino dos animais e dos seres humanos infectados ou portadores. A bactéria é disseminada através de matéria fecal no ambiente, podendo persistir algum tempo (Pinto, 1996; Ferreira *et al.*, 2010).

A *Salmonella* é um dos microrganismos mais envolvidos em surtos de doenças de origem alimentar. Alguns investigadores referem que o aumento dos problemas com salmonelas se deve a vários fatores entre os quais a utilização de métodos incorrectos de

armazenamento dos alimentos, o crescente hábito de consumo de alimentos crus ou incorrectamente cozinhados, o incremento do comércio internacional dos alimentos e ainda a diminuição das resistências do Homem às infeções devido ao aumento dos níveis de higiene (Pinto, 1996). A *Salmonella* é uma bactéria que se adaptou rapidamente aos antibióticos desenvolvendo resistência a estes antimicrobianos. A emergência deste patogénicos resistente a antibióticos é um fenómeno de preocupação na área clínica, pois a sua resistência pode comprometer o tratamento de infeções alimentares severas (Newell & Masson, 2010).

Segundo Lacasse (1995), a incidência de salmoneloses é muitas vezes cíclica, atingindo um ponto máximo nos meses estivais (Julho a Setembro), onde a temperatura ambiente é mais propícia ao desenvolvimento de bactérias nos alimentos e a frequência de piqueniques e de banquetes frios é mais frequente nesta época do ano. Os alimentos mais associados a infeções por salmonela são os ovos, leite, chocolates, carnes frescas, frutos, ervas aromáticas (Lacasse, 1995).

Os sintomas manifestam-se sobretudo através de diarreia e dores abdominais acompanhadas, na maioria dos casos, de febre a febre entérica durante 2 a 3 dias. O período de incubação é de 6 horas a 48 horas, normalmente 12 a 14 horas.

No Brasil, entre 1999 a 2008, dos 2974 surtos que ocorreram, 42,9% dos casos foram de salmonelose transmitidos por ingestão de produtos prontos a servir (Borsoi *et al.*, 2010). Al-Goblan & Jahan (2010) mostraram que em 2006 na Arábia Saudita, 251 casos de doenças de origem alimentar 81% foram causadas pela *Salmonella*, que foram transmitidos pelo consumo de ovos, leite e carne. Um estudo a nível da União Europeia, verificou-se que a *Salmonella* foi a bactéria que provocou mais surtos, 63,6% em 2005. Os 590 surtos registados afectaram 8.922 pessoas, 1.773 das quais foram hospitalizadas e resultaram em 10 mortes (Morgado, 2007). Em Portugal, entre 1997 a 2005 os registos indicam que ocorreram 7 casos provocados pela *Salmonella spp.* e 42 casos pela *Salmonella enteritidis* (Morgado, 2007).

1.6.2.2. *Clostridium*

O género *Clostridium* apresenta a forma bastonetes móveis por flagelos períquios, esporulados, Gram positivos e anaeróbios estritos. Este género inclui a espécie *C.*

perfringens, que produz uma enterotoxina de elevado peso molecular que é sensível ao calor. Encontra-se frequentemente no tubo digestivo dos seres humanos e de vários animais. Os esporos sobrevivem à cozedura multiplicando-se rapidamente. A sua capacidade de esporular leva a uma distribuição ampla desta bactéria. (Lacasse, 1995; Pinto, 1996; Araújo, 1997).

Segundo Araújo (1997), os pratos confeccionados de véspera para consumo no dia seguinte estão na origem de um grande número de intoxicações, sobretudo pratos de carne com molho que após confeção arrefecem lentamente e no dia seguinte são insuficientemente aquecidos. Aparece também em vegetais crus, massas, gelatinas, farinha, pão, sopa e produtos de pastelaria. Os incidentes de intoxicação alimentar por *C. perfringens* dão-se com mais frequência em instituições tais como hospitais, escolas ou residências universitárias, onde são preparadas refeições em larga escala (Eley, 1996). Esta forma de distúrbio alimentar é bastante frequente nos Estados Unidos, Inglaterra e nos países da América do Sul incluindo o Brasil (Scarcelli & Piatti, 2002).

As infeções por *Clostridium perfringens* são caracterizados por os primeiros sintomas de gastroenterite aparecerem, geralmente, 6 a 24 horas após a refeição. A doença é marcada por dores abdominais agudas acompanhadas por flatulência e por uma diarreia abundante, surgindo, por vezes, náuseas, anorexia e cefaleias ligeiras (Eley, 1996; Araújo, 1997; Ferreira *et al.*, 2010). Estas infeções são frequentes em todo o mundo. No Canadá, entre 1984 e 1986 o *C. perfringens* ocupou o segundo lugar nas intoxicações alimentares (Lacasse, 1995). Estados Unidos durante as últimas 2 décadas pelo menos 10 a 20 surtos foram relatados anualmente (Aguilera *et al.*, 2005).

1.6.2.3. *Listeria*

Esta espécie apresenta a forma de bastonetes curtos, regulares, não esporulados, móveis por flagelos peritríquios, Gram positivos e anaeróbios facultativos (Pinto, 1996).

A *Listeria* é um agente etiológico de infeções alimentares. A sua ingestão com os alimentos não suscita manifestações clínicas na maioria dos indivíduos de boa saúde, no entanto, estes podem tornar-se portadores transitórios deste microrganismo. Nos fetos e recém-nascidos, adultos com as defesas enfraquecidas (idosos, imunodeprimidos,

doentes crónicos, pessoas tratadas com corticosteroides ou imunodepressores) a bactéria pode provocar uma infecção grave, muitas vezes mortal. A doença começa habitualmente com sintomas de tipo gripal (febre, dores de cabeça, dores de garganta), diarreia discreta, podendo provocar abortos em grávidas. O seu período de incubação é de 2 a 6 semanas (Abrahão, 2005; Ferreira *et al.*, 2010; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2010).

Está largamente distribuída na natureza, com particular incidência na matéria orgânica em decomposição. As infeções por *Listeria* encontram-se normalmente associadas a carnes frescas, em particular carne de porco e frango, ao leite cru ou deficientemente pasteurizado, saladas, peixe fumado, enchidos, queijos, patés, camarões e manteiga (Pinto, 1996).

Alguns estudos tem mostrado que diversos alimentos crus podem estar fracamente contaminados por *Listeria*, mas o seu armazenagem no frigorífico pode permitir que a bactéria atinja níveis suficientemente elevados para se tornar infecciosa. Esta bactéria pode multiplicar-se a temperatura de refrigeração, estando os alimentos frescos e prontos a comer mais susceptíveis a esta contaminação, tornando-se numa doença emergente, associada à mudança de hábitos de alimentação da sociedade (Lacasse, 1995; Pérez-Rodríguez *et al.*, 2010).

Dados estatísticos têm mostrado que a incidência da *Listeria* diminuiu, mas a presença deste microrganismo nos alimentos continua a ser frequentemente. Um estudo na Suíça entre 1983 a 1987, ocorreram 57 casos de listeriose incluindo 18 mortes (Büla *et al.*, 1995). Dois surtos de *Listeria monocytogenes* em França em 2000 e nos E.U.A., em 1999, foram causados por contaminação de língua de porco e cachorros quentes (WHO, 2002). Em 2001, houve um surto na Suécia, no qual 48 pessoas apresentaram gastroenterite após consumir produtos lácteos (Carrique-Mas *et al.*, 2003). No Japão, em 2001, ocorreu 84 casos de listeriose atribuídas ao consumo de queijo (Makino *et al.*, 2005). Martinelli (2007) mostrou que em 2004 que nos Estados Unidos, 47 casos de listeriose, que foram transmitidos principalmente por carne pronta a comer e queijo fresco não pasteurizado. Um surto em Portugal, desde Janeiro de 2009, na zona de Setúbal e Almada, ocorreram 24 casos, 13 das quais morreram (Castro, 2011).

1.6.2.4. *Staphylococcus aureus*

Esta espécie apresenta células de forma esférica, de 0,5 a 1,5 micrómetros de diâmetro, formando arranjos irregulares, imóveis, não esporulados, Gram positivos e anaeróbios facultativos (Pinto, 1996).

A intoxicação estafilocócica é uma das principais causas de intoxicação alimentares de origem bacteriana em todo o mundo (Lacasse, 1995; Aycicek *et al.*, 2005). O *Staphylococcus aureus* apresenta distribuição mundial e estima-se que 20% até 60% da população humana possa ser portador desta bactéria, sem apresentar qualquer tipo de doença (Lacasse, 1995). A sua presença nos alimentos podem provir dos próprios manipuladores de alimentos que podem ser apenas portadores ou apresentar infecção (Araújo, 1997).

Os *Staphylococcus aureus* são bactérias que vivem em contacto íntimo com o Homem, numa relação habitual de comensalismo ou mutualismo. São habitantes usuais da pele, das membranas mucosas do trato respiratório superior (Aycicek *et al.*, 2005; Loeto *et al.*, 2007). Os principais sintomas são a irritação da mucosa, causando as dores abdominais e a diarreia, náuseas e vômitos (Cunha & Cunha, 2007). O tempo de incubação é de 1 hora a 6 horas após a ingestão do alimento contaminado, normalmente 2 a 4 horas (Pinto, 1996). Esta espécie produz enterotoxina termorresistente, não afectada pela exposição a 100°C durante 30 minutos. Os alimentos mais implicados na sua transmissão são os cremes refrigerados, os ovos, carnes preparadas, natas, maionese, fiambre e leite quando incorrectamente refrigerado (Ferreira, 2006; Ferreira *et al.*, 2010).

A contaminação microbiológica dos alimentos por este patogénico tem sido objeto de preocupação constante em diversos países. Nos Estados Unidos, estima-se que, anualmente, entre 1 a 2 milhões de pessoas são vítimas de gastroenterites provocadas por toxinas de *S. aureus* (Fagundes & Oliveira, 2004). No Brasil, segundo os dados do Ministério da Saúde, foram registados 593.212 casos (Cunha & Cunha, 2007). Em Portugal, entre 1993 e 1998, 80% das intoxicações alimentares ocorridas foram causadas pelo agente patogénico *S. aureus* (Batista & Venâncio, 2003).

1.7. Legislação usada para classificar os alimentos prontos a comer do ponto de vista microbiológico

Cada país tem a sua legislação ou segue seus valores guia. A legislação é alterada mediante as necessidades de cada país, sendo assim, os valores guia vão sendo adaptados à realidade, devido a diferenças culturais ou climáticas.

Devido à falta de legislação em Portugal para alimentos prontos a comer preparados em estabelecimentos de restauração colectiva, fez com que os Laboratórios de Microbiologia dos Alimentos do INSA, para combater esta lacuna, desenvolvessem uma tabela de valores guia para este tipo de alimentos. Os dados obtidos pelo INSA ao longo dos anos permitiram agrupar os alimentos prontos a comer em três grupos diferentes (alimentos cozinhados, alimentos mistos e saladas), de acordo com o tipo de ingredientes que entram na sua composição, o tratamento térmico ou outro procedimento que lhes é aplicado (Santos *et al.*, 2005). Esta legislação baseia-se no uso de valores guia para apreciação de resultados analíticos, isto é, limites a partir dos quais as determinações microbiológicas quantitativas e qualitativas permitem qualificar o produto segundo níveis de qualidade/segurança. Este tipo de classificação permite pôr em evidência a necessidade de implementação de medidas corretivas posteriores (Santos *et al.*, 2005).

Os termos usados pela classificação do INSA para expressar a qualidade microbiológica nos alimentos cozinhados prontos a comer são: satisfatório, os resultados analíticos indicam uma boa qualidade microbiológica; aceitável, os resultados analíticos indicam que o produto se encontra dentro dos limites estabelecidos; não satisfatórios, os resultados analíticos indicam que o produto não satisfaz um ou mais dos valores estabelecidos; inaceitável/potencialmente perigoso, os resultados analíticos indica a presença de microrganismos patogénicos ou toxinas que poderão constituir um risco para a saúde (Santos *et al.*, 2005).

Na Tabela 3 são apresentados os valores guia usados em Portugal. Comparando estes valores com os valores guia do Reino Unido, Hong Kong e Austrália (Tabelas 4 e 5), verifica-se que os valores guia portugueses são os mais rigorosos. A Austrália, usa uma legislação muito menos rigorosa para este grupo de alimentos. O Reino Unido e Hong

Kong regem-se pelos mesmos valores guia que são mais rigorosos que os valores usados na Austrália mas menos rigorosos que os valores usados em Portugal.

Tabela 3 – Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer de Portugal (Santos *et al.*, 2005).

Microrganismos	Grupo de alimentos	Qualidade Microbiológica (ufc/g quando não indicado)			
		Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável
Microrganismos a 30°C	1	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	NA
	2	$\leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^5$	$> 10^5$	NA
	3	$\leq 10^4$	$>10^4 \leq 10^6$	$> 10^6$	NA
Leveduras	1 e 2	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	NA
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^5$	$> 10^5$	NA
Bolores	1 e 2	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$> 10^2$	*
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^3$	$> 10^3$	*
Coliformes totais	1	≤ 10	$>10 \leq 10^2$	$> 10^2$	NA
	2	≤ 10	$>10 \leq 10^3$	$> 10^3$	NA
	3	$\leq 10^2$	$>10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$	NA
<i>E.coli</i>	1 e 2	< 10	NA	≥ 10	NA
	3	≤ 10	$>10 < 10^2$	$\geq 10^2$	NA
<i>Listeria spp.</i>	1, 2 e 3	$< 10^2$	NA	$\geq 10^2$	NA
Patogénicos					
<i>Staphylococcus aureus</i>	1, 2 e 3	$< 10^2$	NA	$\geq 10^2 \leq 10^4$	$> 10^4$
<i>Listeria monocytogenes</i>	3	Ausente em 25g	Presente em 25g $< 10^2$ *	-	$\geq 10^2$
<i>Salmonella</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
<i>Clostridium sulfito redutores</i>	1, 2 e 3	≤ 10	$>10 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$ *
<i>Bacillus cereus</i>	1, 2 e 3	$>10^2$	$\geq 10^2 \leq 10^3$	$>10^3 \leq 10^5$	$\geq 10^5$
<i>Clostridium perfringens</i>	1, 2 e 3	< 10	$>10 \leq 10^3$	$>10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Campylobacter spp.</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1, 2 e 3	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g

Grupo de alimentos: 1 – alimentos cozinhados, 2 – alimentos mistos, 3 – saladas.

* - Equacionado caso a caso , NA – Não aplicável

Na legislação portuguesa, os alimentos são classificados em três grupos. Grupo 1, refeições, sandes, bolos, sobremesas doces totalmente cozinhados, ou adicionados de especiarias, ervas aromáticas secas, desidratadas ou tratadas por radiação ionizante, de produtos UHT e de maionese industrializada; grupo 2, refeições, sandes, bolos, sobremesa doces cozinhadas adicionadas de ingredientes crus e/ou com flora específica própria e grupo 3, saladas, vegetais e frutos crus.

Tabela 4 - Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer do Reino Unido (Gilbert *et al.*, 2000) e de Hong Kong (Kam *et al.*, 2001).

Microrganismos	Grupo de alimentos	Qualidade Microbiológica (ufc/g quando não indicado)			
		Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável
Microrganismos a 30°C	1	$< 10^3$	$10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$	NA
	2	$< 10^4$	$10^4 < 10^5$	$\geq 10^5$	NA
	3	$< 10^5$	$10^5 < 10^6$	$\geq 10^6$	NA
	4	$< 10^6$	$10^6 < 10^7$	$\geq 10^7$	NA
	5	NA	NA	NA	NA
Microrganismos indicadores					
Coliformes totais	1-5	< 100	$100 < 10^4$	$\geq 10^4$	NA
<i>E.coli</i> (total)	1-5	< 20	$20 < 100$	≥ 100	NA
<i>Listeria spp</i> (total)	1-5	< 20	$20 < 100$	≥ 100	NA
Patogénicos					
<i>Staphylococcus aureus</i>	1-5	< 20	$20 < 100$	$100 < 10^3$	$\geq 10^4$
<i>Listeria monocytogenes</i>	1-5	Ausente em 25g	$20 < 100$	NA	≥ 100
<i>Salmonella spp</i>	1-5	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
<i>Campylobacter spp</i>	1-5	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
<i>E.coli</i> O157	1-5	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
<i>V. cholerae</i>	1-5	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
<i>V. parahaemolyticus</i>	1-5	< 20	$20 < 100$	$100 < 10^4$	$\geq 10^3$
<i>C. perfringens</i>	1-5	< 20	$20 < 100$	$100 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Bacillus spp</i>	1-5	$< 10^3$	$10^3 < 10^4$	$10^4 < 10^5$	$\geq 10^5$

NA – Não aplicável

Na legislação do Reino Unido e Hong Kong os alimentos são classificados em cinco grupos. Grupo 1, Hambúrguer, Kababs, peixe em salmoura, Tortas, flans e tortas e aves; grupo 2, salsichas, bolos sem creme, tortas, maionese, legumes cozinhados, massa e pizza; grupo 3, patés, empadas de carne, crustáceas, peixes cozinhados, frutos do mar,

bolos com creme, chamuça, salada, frutas secas, arroz e sandes sem salada; grupo 4, conservas de carne, presunto, tripas, peixe fumado e sandes com salada e grupo 5, enchidos, carnes fumadas, ostras, bolo de queijo, requeijão, alimentos fermentados, frutas e produtos hortícolas frescos, queijo e iogurte.

Tabela 5 - Valores guia para avaliação da qualidade microbiológica de alimentos cozinhados prontos a comer de Austrália (NSW, 2009).

Microrganismos	Qualidade Microbiológica (ufc/g quando não indicado)			
	Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável
Microrganismos a 30°C				
Categoria A	$< 10^4$	$< 10^5$	$\geq 10^5$	NA
Categoria B	$< 10^6$	$< 10^7$	$\geq 10^7$	NA
Categoria C	NA	NA	NA	NA
Microrganismos indicadores				
Coliformes totais	$< 10^2$	$10^2 < 10^4$	$\geq 10^4$	NA
E. coli	< 3	$3 < 10^2$	$\geq 10^2$	NA
Patogénicos				
<i>Staphylococcus aureus</i>	$< 10^2$	$10^2 < 10^3$	$10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>C. perfringens</i>	$< 10^2$	$10^2 < 10^3$	$10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>B. cereus</i>	$< 10^2$	$10^2 < 10^3$	$10^3 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>V. parahaemolyticus</i>	< 3	$3 < 10^2$	$10^2 < 10^4$	$\geq 10^4$
<i>Campylobacter spp</i>	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
<i>Salmonella spp</i>	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g
<i>Listeria monocytogenes</i>	Ausente em 25g	-	-	Presente em 25g

NA – Não aplicável

Os alimentos na Austrália classificados três categorias denominadas por A, B e C. Categoria A, aplica-se aos alimentos prontos para consumo, em que todos os componentes são totalmente cozidos para venda imediata ou consumo (por exemplo torta de carne); categoria B, aplica-se aos alimentos prontos para consumo que são totalmente cozinhados com subsequente manuseamento ou transformação antes do consumo (por exemplo creme de pastelaria) e a categoria C, são alimentos que contêm ingredientes fermentados ou frutas frescas e produtos hortícolas (por exemplo *take away*, frutas e iogurte).

1.8. Objetivo do Estudo

O objetivo deste trabalho foi avaliar a qualidade microbiológica dos alimentos servidos em cantinas escolares, restaurantes e lares da terceira idade do Distrito de Aveiro durante o período de 2004 e 2010.

Para atingir este objetivo procedeu-se à:

- ❖ classificação dos alimentos de acordo com a legislação em vigor (Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge);
- ❖ avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos durante o período de estudo;
- ❖ avaliação dos grupos microbiológicos que mais frequentemente ultrapassa os valores legislados;
- ❖ avaliação da qualidade microbiológica dos utensílios usados na confeção dos alimentos.

2. Material e Métodos

2.1. Caracterização do local de estudo

O Distrito de Aveiro está localizado, maioritariamente, na Região da Beira Litoral. Este distrito tem uma superfície territorial de 2.799,6 Km² e abrange dezanove municípios.

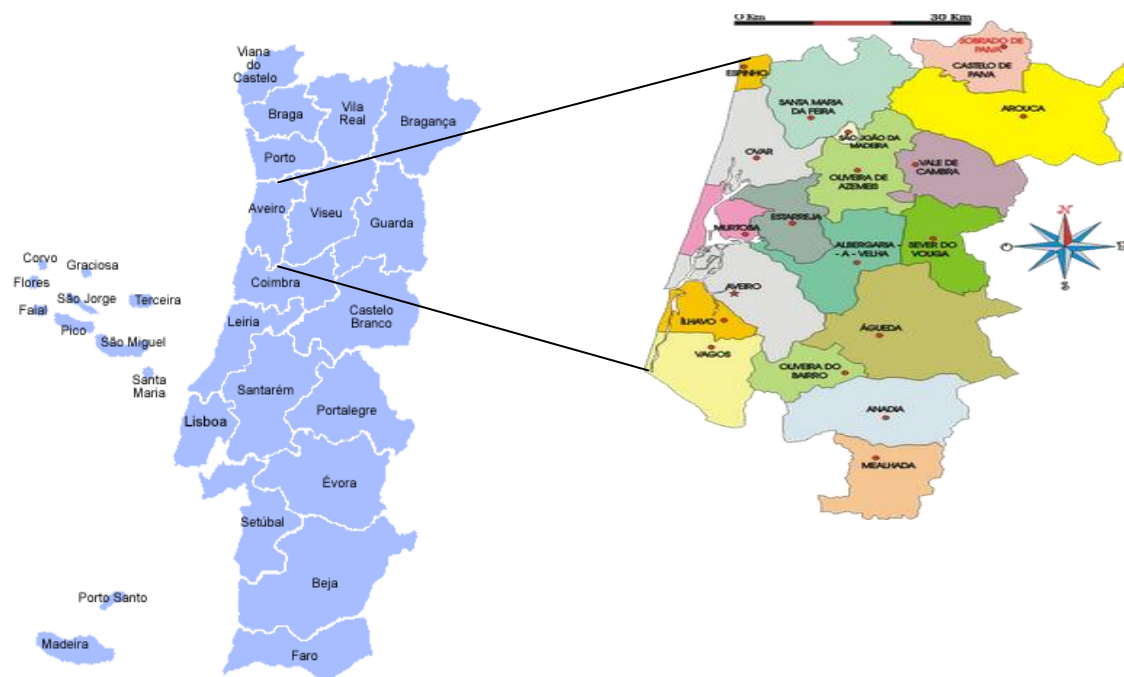


Figura 1 - Mapa de Portugal e mapa do Distrito de Aveiro (Retirado de [1]).

O estudo foi realizado em 17 localidades do Distrito de Aveiro, Águeda, Anadia, Arouca, Aveiro, Castelo de Paiva, Espinho, Estarreja, Ílhavo, Mealhada, Murtosa, Oliveira de Azeméis, Oliveira do Bairro, Ovar, Santa Maria da Feira, Sever do Vouga, Vagos e Vale de Cambra.

2.2. Dados utilizados

Neste estudo foram analisados os resultados das análises de alimentos servidos em cantinas escolares, restaurantes e lares da terceira idade do Distrito de Aveiro, foram também analisados utensílios usados na confeção/serviço dos alimentos. As análises foram realizadas no Laboratório Distrital de Saúde Pública de Aveiro entre 2004 e 2010.

As análises microbiológicas foram realizadas de forma a cumprir o programa de vigilância de qualidade dos alimentos, que é da responsabilidade das autoridades de saúde de cada concelho. As amostras das cantinas foram obtidas em jardins de infância, escolas EB 1,2,3, escolas secundárias e universidades. As amostras dos lares foram colhidas em centros sociais, centros comunitários, centros culturais e centros de dia. As amostras dos restaurantes foram obtidas em cafés, hospitais, padarias e pastelarias.

Durante o período de estudo deste trabalho não há dados microbiológicos dos alimentos e utensílios nos restaurantes em 2010.

Os dados foram tratados com o software Statistical Package for the Social Sciences (SPSS), versão 18 para Windows. O programa de Microsoft Office Excel 2007 foi utilizado para elaboração de gráficos.

2.3. Legislação utilizada para classificação dos alimentos e utensílios do ponto de vista microbiológico

A legislação para alimentos prontos a comer, preparados em estabelecimentos de restauração coletiva, foi a legislação elaborada pelos Laboratórios de Microbiologia dos Alimentos do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) (Tabela 3). Baseia-se no uso de Valores Guia para apreciação de resultados analíticos, isto é, limites a partir dos quais as determinações microbiológicas quantitativas e qualitativas permitem qualificar o produto segundo níveis de qualidade/segurança.

Para melhor compreensão da situação global, os dados foram tratados agrupando os quatro grupos em apenas duas categorias, amostras Satisfatórias (Satisfatório+Aceitável) e amostras Não Satisfatórias (Não aceitável+Inaceitável).

Os termos usados pela classificação do INSA para expressar a qualidade microbiológica dos utensílios usados nos alimentos são: bom, aceitável, não aceitável e mau.

2.4. Análises Microbiológicas dos Alimentos e Utensílios

2.4.1. Colheita e transporte de Amostras

As amostras foram recolhidas após a fase final de preparação por técnicos de saúde ambiental, com material estéril e colocadas em sacos esterilizados segundo a norma NP-1828, transportadas e refrigeradas entre 1 e 8°C para o laboratório o mais depressa possível, onde foram realizadas as análises microbiológicas.

Em cada local foi feita uma zaragatoa a utensílios e/ou superfícies da zona de serviço e confeção das refeições.

As amostras foram colhidas com uma zaragatoa. A zaragatoa foi humedecida em triptona salina estéril, e passada em cinco utensílios iguais. As zaragatoas foram transportadas em tubos individuais com 10 ml de água peptonada a 4°C.

2.4.2. Microrganismos estudados

Nos alimentos, procedeu-se à contagem de bactérias aeróbias mesófilas, bolores, leveduras, coliformes totais e coliformes fecais, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e esporos de clostrídeos sulfito-redutores. Pesquisou-se ainda a incidência de *Listeria spp.* e *Listeria monocytogenes* (em saladas e pratos com molhos) e *Salmonella*.

Nos utensílios foram efetuadas contagens de bactérias aeróbias mesófilas, bolores, leveduras, coliformes totais e coliformes fecais.

2.4.3. Pesquisa de microrganismos em alimentos

2.4.3.1. Preparação da amostra

Pesaram-se assepticamente 25 g de cada amostra que foram adicionados de 225 ml de triptona salina estéril. A amostra foi então homogeneizada num Stomacher 400 (Seward). A partir da diluição efetuada, foram retiradas alíquotas para a preparação das restantes diluições decimais apropriadas.

2.4.3.2. Métodos de detecção

Determinação do número de microrganismos a 30°

As amostras diluídas (1 ml) foram semeadas, em duplicado, utilizando-se a técnica de sementeira por incorporação e o meio de cultura “plate count agar” (PCA). Após solidificação do meio agarizado, as placas foram invertidas e incubadas a 30°C por 72 horas (ISO 4833:2003). No final da incubação foi efetuada a contagem do número total de colónias na diluição mais indicada.

Determinação do número de bolores e leveduras

Um mililitro da suspensão-mãe e das respectivas diluições decimais foram semeadas, em duplicado, pela técnica de sementeira por incorporação em meio de Oxytetracycline Glucose Yeast extract agar (OGY) suplementado com oxytretraciclina. Após a solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubadas a 25°C durante 72 horas (ISO 7954:1987). No final da incubação foi efetuada a contagem do número total de colónias de bolores e leveduras na diluição mais indicada.

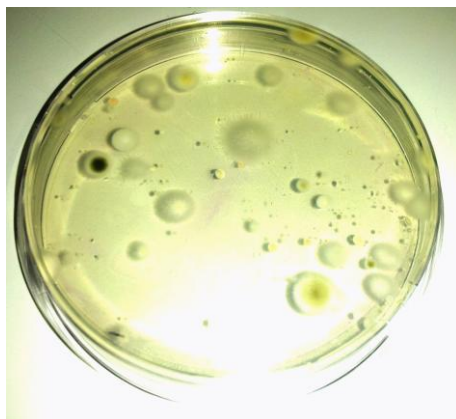


Figura 2 - Bolores e leveduras em meio OGY.

Determinação do número de coliformes a 30°C

A amostra diluída foi semeada por incorporação, em duplicado, em meio de gelose lactosada biliada com cristal de violeta e vermelho neutro (VRBL) em dupla camada. Após a solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubação a 30°C durante 24 horas. No final da incubação foram contadas as colónias características (colónias de cor

vermelho escuro que possuam um diâmetro de pelo menos 0,5 mm, com auréola de precipitado), (ISO 4832:2006).

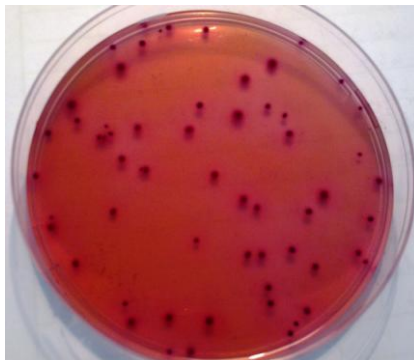


Figura 3 - Coliformes totais a 30°C em meio VRBL.

Determinação do número de coliformes fecais

A amostra diluída foi semeada por incorporação, com dupla camada em meio de gelose lactosada biliada com cristal de violeta e vermelho neutro (VRBL). Após a solidificação do meio, as placas foram invertidas e incubação a 44°C durante 24 horas. No final da incubação foram contadas as colónias características (colónias de cor vermelho escuro que possuam um diâmetro de pelo menos 0,5 mm, com auréola de precipitado) (ISO 4832:2006). Faz-se a confirmação em TSI a 37°C durante 24 horas, depois é passado para schubeert a 44°C durante 24 horas e para citrato a 37°C durante 24 horas.

Determinação do número de *Escherichia coli*

De cada diluição decimal foi retirado 1 ml, que foi semeado por incorporação em meio Chromocult TBX agar. Após solidificação do meio as placas foram invertidas e incubadas a 44°C entre 18 a 24 horas. No final da incubação foram contadas as colónias características (colónias azuis ou azuis-esverdeadas) na diluição mais indicada (ISO 16649-2:2001).

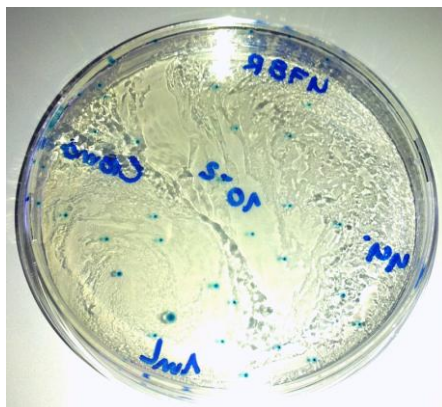


Figura 4 - *E. coli* em meio Chromocult TBX

Determinação do número de *Staphylococcus aureus*

Da diluição inicial, foram semeadas por sementeira à superfície por espalhamento 0,1 ml em placas de Baird Parker com gema de ovo. Após secagem, as placas foram invertidas e incubadas a 37°C por 24 a 48 horas. As colónias típicas (colónias negras com halo transparente) foram coradas pela técnica de coloração de Gram e submetidas ao teste da coagulase usando plasma de coelho (ISO 6888-1:1999).



Figura 5 - *Staphylococcus aureus* em meio Baird Parker

Determinação do número de esporos de clostrídeo sulfito-redutores

Foi utilizado o meio de cultura Iron Sulphite Meat Liver concentração dupla. As amostras diluídas foram aquecidas a 80°C durante 10 minutos e adicionado ao meio. Após solidificação do meio os tubos foram incubados a 37°C durante 24 a 48 horas. No final da incubação foi efetuada a contagem de colónias pretas (NP 2262:1986).



Figura 6 – Esporos de clostrídeo sulfito-redutores em meio Iron Sulphite Meat Liver

Pesquisa de *Salmonella*

Foi efectuado um pré-enriquecimento em água peptonada tamponada (25 g de alimento em 225 ml) que foi incubada durante 18 horas a 37°C. Após a incubação foi efetuado um enriquecimento em 10 ml de meio Rappaport – Vassiliadis com soja (RVS) (0,1 ml de amostra para 10 ml de meio), em meio de Muller-Kauffmann tetrathionate-novobiocin broth (MKTTn) (1 ml de amostra para 10 ml de meio). A incubação foi efetuada a 41,5°C para o meio RVS e a 37°C para o MKTTn, durante 24 horas. Após a incubação foi feito o isolamento por sementeira à superfície de 0,1 ml em meio *Salmonella Shigella* agar (SS) e em meio Xylose Lysine deoxycholate agar (XLD) a 37°C por 24 horas, faz-se um segundo isolamento e vai incubar durante 48 horas. As colónias características ou suspeitas (colónias com o centro preto e zona transparente à volta em SS, são vermelhas com halo brilhante à volta em XLD) foram sujeitas a testes serológicos (soro Antiserum Poly A) e testes bioquímicos (API 20E) para identificação (ISO 6579: 2002).

Determinação de *Listeria monocytogenes*

Foi efectuado um pré-enriquecimento em 225 ml de Caldo Fraser-Demi com suplemento (25 g de alimento) a 30°C durante 24 horas. Após a incubação foi efetuado enriquecimento em 10 ml de caldo de Fraser com suplemento (0,1 ml do pré-enriquecimento). A incubação foi efetuada a 37°C durante 24 a 48 horas. Após incubação do inoculado à superfície de 0,1 ml da amostra em meio Palcam e em meio Oxford. As

placas foram incubadas a 37°C durante 24 a 48 horas. As colónias características (no meio Oxford as colónias são pequenas (1mm) cinzentas rodeadas de halo preto às 24 horas e às 48 horas são escuras e esverdeadas com halo preto, no meio Palcam as colónias são esverdeadas, às vezes com centro preto mas sempre com halo preto às 48 horas) ou suspeitas foram confirmadas através do teste da catalase e do API *Listeria* (ISO 11290-2:1998).

2.4.4. Pesquisa de microrganismos em utensílios

Os tubos contendo as zaragatoas a superfícies de utensílios foram agitados num agitador automático (vortex) durante aproximadamente 5 minutos. As amostras agitadas foram semeadas para a contagem de microrganismos a 30°C, coliformes fecais, bolores, leveduras e coliformes totais utilizando as mesmas técnicas descritas para a análise de alimentos.

Os resultados das contagens foram expressos em número de unidades formadoras de colónias por grama de alimento (ufc/g) e unidades formadoras de colónias por utensílio (ufc/utensílio). Os resultados das pesquisas dos microrganismos patogénicos foram expressos em presença ou ausência.

3. Resultados

3.1. Alimentos

3.1.1. Caracterização geral das amostras de alimentos do Distrito de Aveiro

Neste estudo foram usadas 3295 amostras, das quais 930 (28%) foram provenientes de lares, 1015 (31%) de restaurantes e 1350 (41%) de escolas (Tabela 6).

Tabela 6 - Caracterização geral das amostras de alimentos analisados durante o período de 2004 a 2010 no Distrito de Aveiro.

			Grupo de Alimento			Total
			Alimentos cozinhados	Alimentos mistos	Saladas	
Proveniência da amostra	Lares	Nº de Amostra	654	33	243	930
		%	29%	24%	28%	
	Restaurantes	Nº de Amostra	745	51	219	1015
		%	32%	37%	26%	
	Escolas	Nº de Amostra	905	55	390	1350
		%	39%	39%	46%	
	Total		2304	139	852	3295

Dos alimentos cozinhados 29% foram colhidos em lares, 32% em restaurantes e 39% em escolas (Tabela 6). No grupo dos alimentos mistos, 24% das amostras foram provenientes de lares, 37% de restaurantes e 39% de escolas. No grupo das saladas, 28% foi colhido em lares, 26% em restaurantes e 41% em escolas. Dos três tipos de locais as escolas foram as mais amostradas.

3.1.2. Classificação microbiológica dos alimentos segundo a legislação do INSA e a classificação em duas categorias

Do total dos alimentos analisados, 44% foram classificados como satisfatórios, 38% como aceitáveis, 15% como não satisfatórios e 3% como inaceitável. No grupo dos alimentos cozinhados a maior percentagem de amostras foi classificada como satisfatórias 60%. Neste grupo 30% das amostras foram aceitável, 9% não satisfatórias e

1% inaceitáveis. No grupo dos alimentos mistos a foi classificada como aceitável 38%, 33% das amostras foram não satisfatórias, 21% satisfatórias e 8% inaceitáveis. Nas saladas mais de metade das amostras foram classificadas como aceitáveis 59%, 31% como não satisfatórias, 5% como satisfatórias e inaceitáveis (Tabela 7).

Tabela 7 - Classificação da amostra de alimentos segundo a classificação da legislação em cada grupo de alimentos.

		Grupo de Alimentos			Total
		Alimentos cozinhados	Alimentos mistos	Saladas	
Satisfatória	Nº de Amostra	1390	29	41	1460
	%	60%	21%	5%	
Aceitável	Nº de Amostra	696	53	500	1249
	%	30%	38%	59%	
Não satisfatória	Nº de Amostra	193	46	267	506
	%	9%	33%	31%	
Inaceitável	Nº de Amostra	25	11	44	80
	%	1%	8%	5%	
Total	Nº de Amostra	2304	139	852	3295

Segundo classificação em duas categorias, no grupo dos alimentos cozinhados, 10% das amostras foram classificadas como não satisfatórias. No grupo dos alimentos mistos a percentagem de amostras não satisfatórias foi de 41% e no grupo das saladas de 36% (Figura 7).

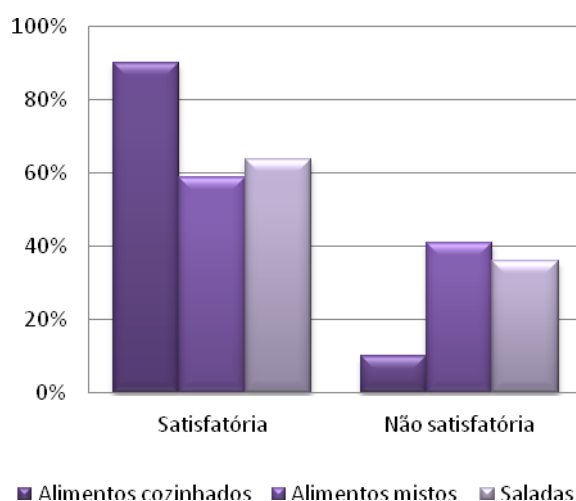


Figura 7 – Avaliação das amostras dentro de cada grupo de alimentos segundo classificação em duas categorias.

Os restaurantes apresentaram um maior número de amostras acima dos valores estabelecidos (Figura 8). Tanto nos restaurantes como nos lares de terceira idade e cantinas escolares os alimentos cozinhados foram os que apresentaram melhor qualidade (Figura 8). A qualidade dos alimentos mistos e saladas foi semelhante (Figura 8).

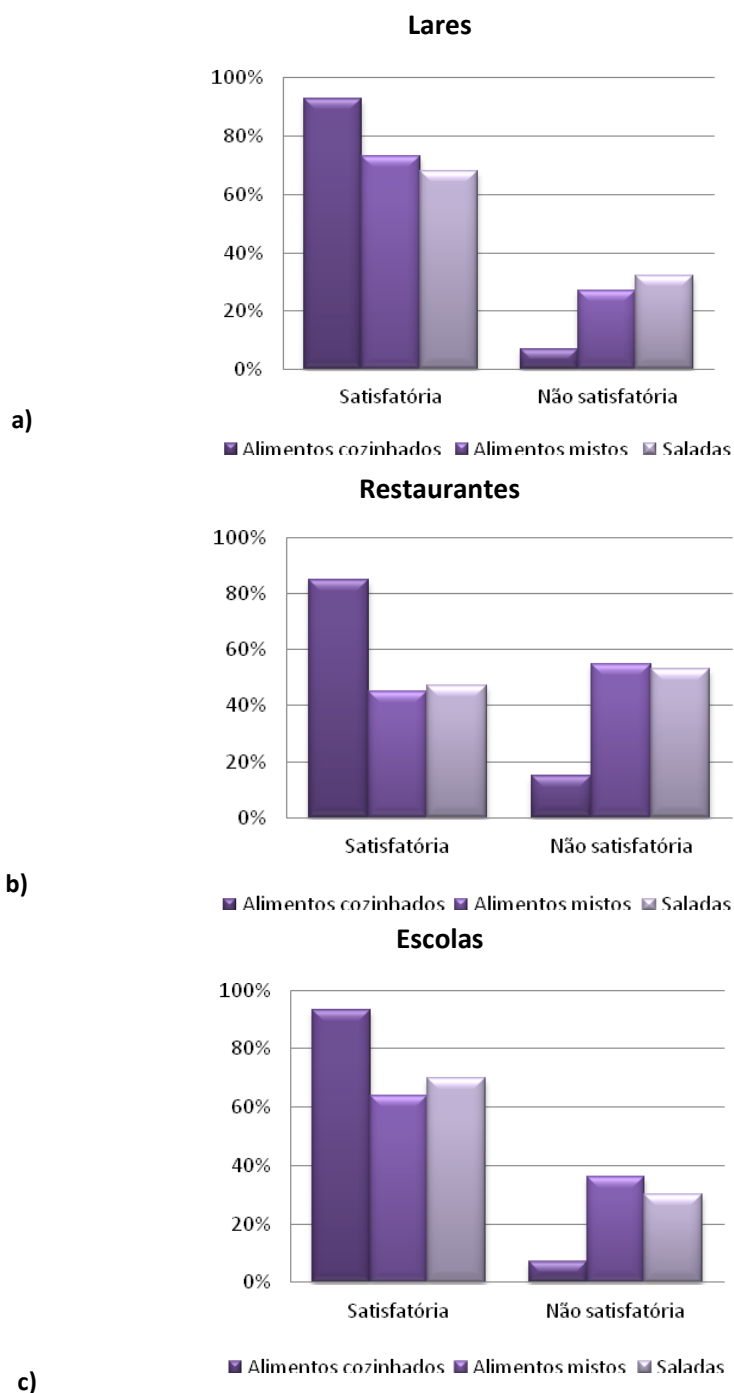


Figura 8 – Avaliação das amostras dentro de cada grupo segundo a classificação em duas categorias. a) lares; b) restaurantes; c) escolas.

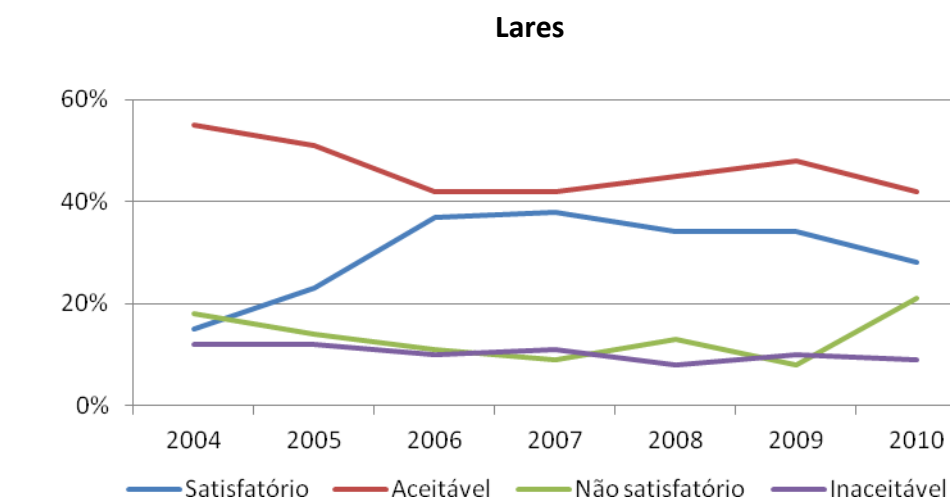
3.1.3. Avaliação da qualidade microbiológica dos alimentos ao longo do período de estudo

Ao longo dos anos o número total de amostras analisadas variam (Tabela 8).

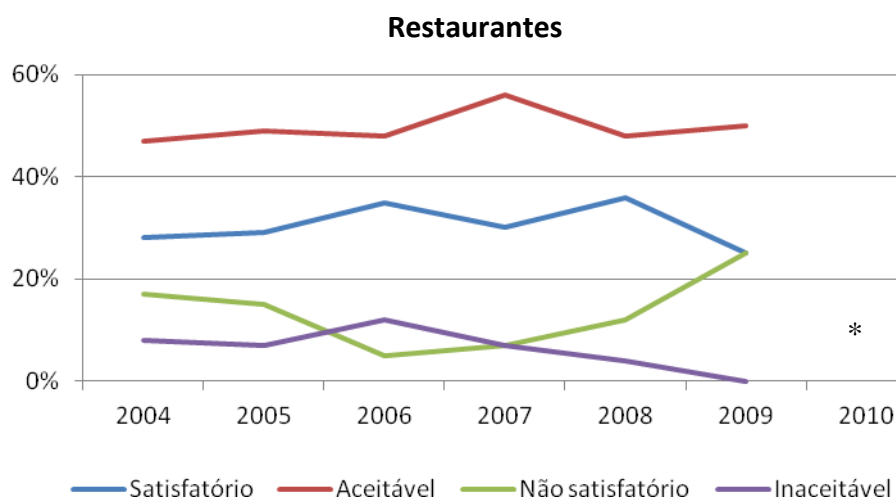
Tabela 8 – Avaliação geral das amostras de alimentos por anos segundo a classificação da legislação.

		Classificação				Total
		Satisfatório	Aceitável	Não satisfatório	Inaceitável	
2004	Nº de amostra	318	223	111	74	726
	%	44%	31%	15%	10%	
2005	Nº de amostra	201	218	116	1	536
	%	37%	41%	21%	1%	
2006	Nº de amostra	204	178	65	1	448
	%	45%	40%	14%	1%	
2007	Nº de amostra	180	142	41	0	363
	%	50%	39%	11%	0%	
2008	Nº de amostra	193	181	61	2	437
	%	44%	41%	14%	1%	
2009	Nº de amostra	129	141	52	2	324
	%	40%	43%	16%	1%	
2010	Nº de amostra	235	166	60	0	461
	%	51%	36%	13%	0%	
Total	Nº de amostra	1460	1249	506	80	3295

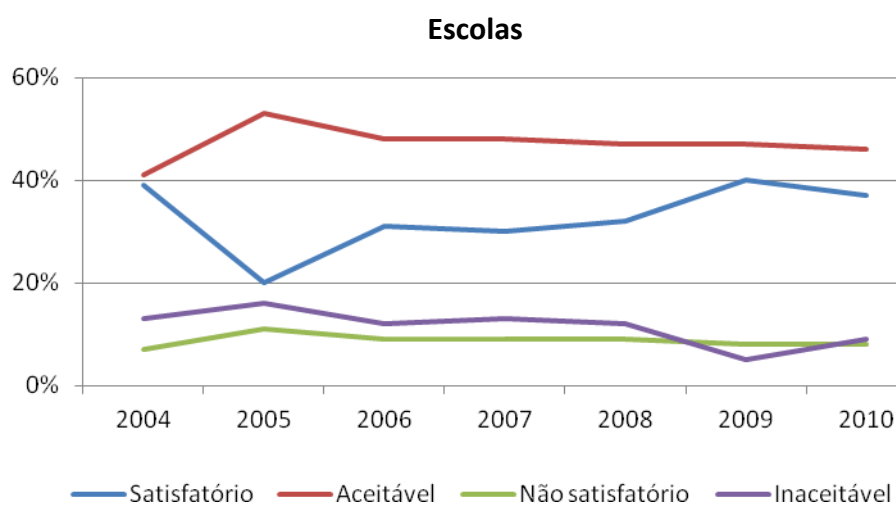
A percentagem de amostras na categoria aceitável, para os três tipos de locais, foi sempre superior a 40%. Nos lares de terceira idade e escolas verificou-se que para a categoria aceitável houve oscilação da percentagem de amostras no início do período de estudo. Com a exceção dos restaurantes em 2009, a percentagem de amostras nas categorias não satisfatórias e inaceitáveis não ultrapassou os 20% (Figura 9).



a)



b)



c)

Figura 9 - Evolução da qualidade das amostras ao longo dos anos segundo a classificação legislada. a) lares; b) restaurantes; c) escolas. * Sem resultados.

Considerando apenas a classificação nas duas categorias verifica-se que nos lares o número de amostra não satisfatórias foi mais baixo que nos outros locais (Figura 10). No geral, para os três locais verificou-se um decréscimo na percentagem de amostra não satisfatórias entre 2004 e 2007-2008. A partir de 2008 verificou-se um agravamento na qualidade microbiológica dos alimentos em todos os locais.

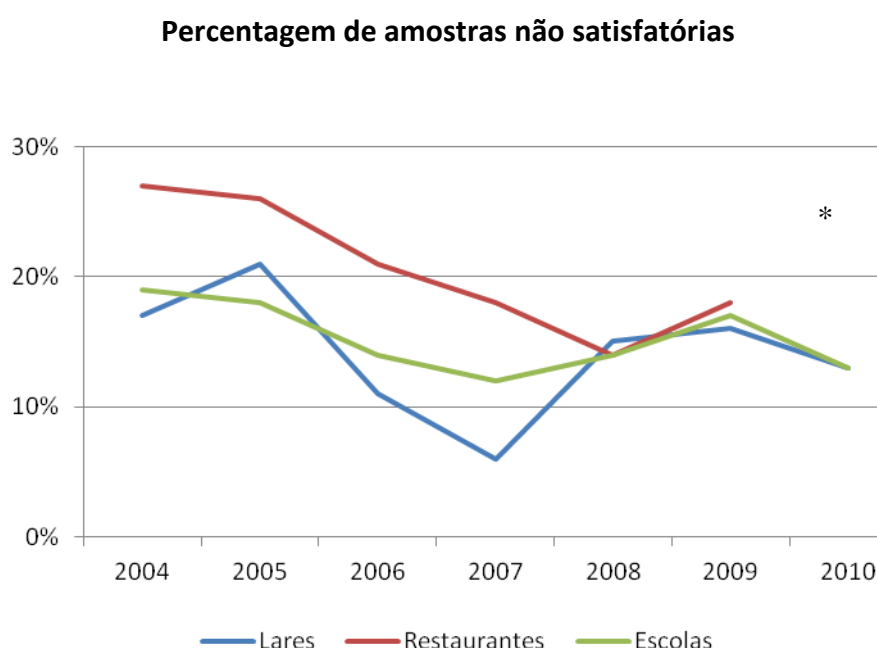


Figura 10 - Evolução das amostras dos alimentos classificadas segundo a classificação em duas categorias nos 3 locais de proveniência ao longo dos anos. * Sem resultados nos restaurantes.

3.1.4. Classificação microbiológica dos alimentos por parâmetro

Foi realizado o tratamento de dados segundo a classificação legislada e segundo a classificação em duas categorias.

A Tabela 9 apresenta a classificação das 3295 amostras estudadas para cada parâmetro e dentro de cada grupo de alimentos.

Tabela 9 - Classificação microbiológica geral das amostras de alimentos por parâmetro. * VG – valores guia, unidades em ufc/g , exceto em *salmonella* e *listeria*.

Parâmetros	Grupo de alimento	Número total de amostras	Valores Guia aceitável (VG) *	Não satisfatórias (> VG)	
				Nº de amostra	%
Microorganismos a 30°C	A.Cozinhados	2304	$\leq 10^4$	224	10%
	A. Mistos	139	$\leq 10^5$	38	27%
	Saladas	852	$\leq 10^6$	181	21%
Leveduras	A.Cozinhados	2304	$\leq 10^4$	21	1%
	A. Mistos	139	$\leq 10^4$	18	13%
	Saladas	852	$\leq 10^5$	22	3%
Bolores	A.Cozinhados	2304	$\leq 10^2$	51	2%
	A. Mistos	139	$\leq 10^2$	33	1%
	Saladas	852	$\leq 10^3$	145	17%
Bactérias coliformes	A.Cozinhados	2304	$\leq 10^2$	163	7%
	A. Mistos	139	$\leq 10^3$	35	25%
	Saladas	852	$\leq 10^4$	149	17%
<i>E. coli</i>	A.Cozinhados	2304	<10	23	1%
	A. Mistos	139	<10	7	5%
	Saladas	852	<10 ²	17	2%
<i>Staphylococcus aureus</i>	A.Cozinhados	2304	<10 ²	19	1%
	A. Mistos	139	<10 ²	1	1%
	Saladas	852	<10 ²	15	2%
<i>Salmonella</i>	A.Cozinhados	2304	Ausente em 25g	2	1%
	A. Mistos	139		0	0%
	Saladas	852		0	0%
<i>Listeria monocytogenes</i>	Saladas	852	Presente em 25g <10 ²	10	1%
Clostrídeos sulfito redutores	A.Cozinhados	2304	$\leq 10^3$	0	0%
	A. Mistos	139	$\leq 10^3$	0	0%
	Saladas	852	$\leq 10^3$	0	0%

De uma forma geral, tanto para a classificação da legislação (Tabela 9) como para a classificação em duas categorias (Tabela 9) o parâmetro que apresenta maior percentagem de amostras classificadas como não satisfatórias, são os microrganismos a 30°C (Tabela 9). Considerando a classificação em duas categorias, os microrganismos a 30°C ultrapassam o valor guia em 19% das amostras. As bactérias coliformes ultrapassam o valor guia em 16% das amostras e os bolores e leveduras em 7% amostras (Tabela 9). Dos microrganismos patogénicos, os *Staphylococcus aureus* foram os microrganismos que mais frequentemente ultrapassaram o valor legislado (em 1% das amostras).

Considerando os diferentes locais de colheita em separado a tendência foi semelhantes, os microrganismos a 30°C e os coliformes foram os grupos que mais

frequente ultrapassaram o valor limite e os *Staphylococcus aureus* foi o patogénico que mais vezes ultrapassou o valor limite (Tabela 10, 11 e 12).

Tabela 10 - Classificação microbiológica das amostras de alimentos por parâmetro em lares. * VG – valores guia, unidades em ufc/g , exceto em *salmonella* e *listeria*.

Parâmetros	Grupo de alimento	Número total de amostras	Valores Guia aceitável (VG) *	Não satisfatórias (> VG)	
				Nº de amostra	%
Microorganismos a 30°C	A.Cozinhados	654	$\leq 10^4$	36	5%
	A. Mistos	33	$\leq 10^5$	8	24%
	Saladas	243	$\leq 10^6$	46	19%
Leveduras	A.Cozinhados	654	$\leq 10^4$	3	1%
	A. Mistos	33	$\leq 10^4$	0	0%
	Saladas	243	$\leq 10^5$	4	2%
Bolores	A.Cozinhados	654	$\leq 10^2$	9	2%
	A. Mistos	33	$\leq 10^2$	3	9%
	Saladas	243	$\leq 10^3$	44	18%
Bactérias coliformes	A.Cozinhados	654	$\leq 10^2$	27	4%
	A. Mistos	33	$\leq 10^3$	6	18%
	Saladas	243	$\leq 10^4$	32	19%
<i>E. coli</i>	A.Cozinhados	654	< 10	4	1%
	A. Mistos	33	< 10	2	6%
	Saladas	243	$< 10^2$	3	1%
<i>Staphylococcus aureus</i>	A.Cozinhados	654	$< 10^2$	1	1%
	A. Mistos	33	$< 10^2$	0	0%
	Saladas	243	$< 10^2$	1	1%
<i>Salmonella</i>	A.Cozinhados	654	Ausente em 25g	0	0%
	A. Mistos	33		0	0%
	Saladas	243		0	0%
<i>Listeria monocytogenes</i>	Saladas	243	Presente em 25g $< 10^2$	2	1%
Clostrídeos sulfito redutores	A. Cozinhados	654	$\leq 10^3$	0	0%
	A. Mistos	33	$\leq 10^3$	0	0%
	Saladas	243	$\leq 10^3$	0	0%

Tabela 11 - Classificação microbiológica das amostras de alimentos por parâmetro em restaurantes. * VG – valores guia, unidades em ufc/g , exceto em *salmonella* e *listeria*.

Parâmetros	Grupo de alimento	Número total de amostras	Valores Guia aceitável (VG) *	Não satisfatórias (> VG)	
				Nº de amostra	%
Microrganismos a 30°C	A.Cozinhados	745	$\leq 10^4$	121	29%
	A. Mistos	51	$\leq 10^5$	18	35%
	Saladas	219	$\leq 10^6$	61	28%
Leveduras	A.Cozinhados	745	$\leq 10^4$	18	2%
	A. Mistos	51	$\leq 10^4$	13	29%
	Saladas	219	$\leq 10^5$	16	3%
Bolores	A.Cozinhados	745	$\leq 10^2$	31	4%
	A. Mistos	51	$\leq 10^2$	17	33%
	Saladas	219	$\leq 10^3$	55	25%
Bactérias coliformes	A.Cozinhados	745	$\leq 10^2$	93	12%
	A. Mistos	51	$\leq 10^3$	18	35%
	Saladas	219	$\leq 10^4$	66	30%
<i>E. coli</i>	A.Cozinhados	745	<10	13	2%
	A. Mistos	51	<10	3	6%
	Saladas	219	<10 ²	7	3%
<i>Staphylococcus aureus</i>	A.Cozinhados	745	<10 ²	12	1%
	A. Mistos	51	<10 ²	0	0%
	Saladas	219	<10 ²	13	6%
<i>Salmonella</i>	A.Cozinhados	745	Ausente em 25g	0	0%
	A. Mistos	51		0	0%
	Saladas	219		0	0%
<i>Listeria monocytogenes</i>	Saladas	219	Presente em 25g <10 ²	0	0%
Clostrídeos sulfito redutores	A.Cozinhados	745	$\leq 10^3$	0	0%
	A. Mistos	51	$\leq 10^3$	0	0%
	Saladas	219	$\leq 10^3$	0	0%

Tabela 12 - Classificação microbiológica das amostras de alimentos por parâmetro em escolas. * VG – valores guia, unidades em ufc/g , exceto em *salmonella* e *listeria*.

Parâmetros	Grupo de alimento	Número total de amostras	Valores Guia aceitável (VG) *	Não satisfatórias (> VG)	
				Nº de amostra	%
Microrganismos a 30°C	A.Cozinhados	905	$\leq 10^4$	67	7%
	A. Mistos	55	$\leq 10^5$	12	22%
	Saladas	390	$\leq 10^6$	75	19%
Leveduras	A.Cozinhados	905	$\leq 10^4$	0	0%
	A. Mistos	55	$\leq 10^4$	5	9%
	Saladas	390	$\leq 10^5$	2	1%
Bolores	A.Cozinhados	905	$\leq 10^2$	11	1%
	A. Mistos	55	$\leq 10^2$	13	24%
	Saladas	390	$\leq 10^3$	46	12%
Bactérias coliformes	A.Cozinhados	905	$\leq 10^2$	43	5%
	A. Mistos	55	$\leq 10^3$	11	20%
	Saladas	390	$\leq 10^4$	51	13%
<i>E. coli</i>	A.Cozinhados	905	<10	6	1%
	A. Mistos	55	<10	2	4%
	Saladas	390	<10 ²	7	2%
<i>Staphylococcus aureus</i>	A.Cozinhados	905	<10 ²	6	1%
	A. Mistos	55	<10 ²	1	2%
	Saladas	390	<10 ²	1	1%
<i>Salmonella</i>	A.Cozinhados	905	Ausente em 25g	0	0%
	A. Mistos	55		0	0%
	Saladas	390		0	0%
<i>Listeria monocytogenes</i>	Saladas	390	Presente em 25g <10 ²	8	2%
Clostrídeos sulfito redutores	A.Cozinhados	905	$\leq 10^3$	0	0%
	A. Mistos	55	$\leq 10^3$	0	0%
	Saladas	390	$\leq 10^3$	0	0%

3.2. Utensílios

3.2.1. Caracterização geral das amostras de utensílios

Foram analisadas 2031 amostras de utensílios, entre 2004 e 2010 (Tabela 13). Destas 696 amostras (34%) foram feitas em lares, 851 amostras (42%) em restaurantes e 484 amostras (24%) em escolas (Tabela 13). Pela classificação da legislação as amostras provenientes de lares foram classificadas como aceitáveis 46% amostras, 31% amostras classificadas “bom”, 14% amostras classificadas não aceitáveis e 9% amostras classificadas “mau”. Nos restaurantes 48% amostras foram classificadas aceitáveis, 29% amostras classificadas “bom”, 15% amostras classificadas não aceitáveis e 8% amostras classificadas “mau”. Nas escolas 48% amostras foram classificadas aceitáveis, 32% amostras classificadas “bom”, 11% amostras classificadas “mau” e 9% amostras classificadas como não aceitáveis (Tabela 13).

Segundo a classificação em duas categorias foram classificadas como não satisfatória, 24% das amostras em lares, 23% em restaurantes e 20% em escolas (Tabela 13).

Tabela 13 - Classificação da amostra de utensílios segundo a classificação da legislação e o segundo a classificação em duas categorias.

			Proveniência Amostra			Total
			Lares	Restaurantes	Escolas	
Classificação da legislação	Bom	Nº de amostra	213	142	274	629
		%	31%	29%	32%	
	Aceitável	Nº de amostra	317	233	406	956
		%	46%	48%	48%	
	Não aceitável	Nº de amostra	97	72	77	246
		%	14%	15%	9%	
Mau	Nº de amostra	69	37	94	200	
	%	9%	8%	11%		
Classificação em duas categorias	Não satisfatória	Nº de Amostra	166	109	171	446
		%	24%	23%	20%	
Total		Nº de amostra	696	851	484	2031

3.2.2. Avaliação da qualidade microbiológica dos utensílios ao longo do período de estudo

Ao longo dos anos notou-se que a classificação das amostras não sofreu grandes oscilações (Tabela 14). A maior parte das amostras (40%) durante o período de estudo foram classificadas na categoria aceitável (Tabela 14). A categoria que apresentou a menor percentagem foi a categoria “mau”.

Tabela 14 - Avaliação geral das amostras de utensílios por anos segundo a classificação legislada e segundo a classificação em duas categorias.

			Classificação da legislação					Total
			Bom	Aceitável	Não aceitável	Mau		
Ano	2004	Nº de Amostra	107	178	60	33	93	378
		%	28%	47%	16%	9%	25%	
	2005	Nº de Amostra	77	165	42	38	80	322
		%	24%	51%	13%	12%	25%	
	2006	Nº de Amostra	98	136	28	33	61	295
		%	33%	46%	10%	11%	21%	
	2007	Nº de Amostra	74	105	20	26	46	225
		%	33%	47%	9%	11%	20%	
	2008	Nº de Amostra	91	128	30	26	56	275
		%	33%	46%	11%	10%	20%	
	2009	Nº de Amostra	77	99	18	14	32	208
		%	37%	48%	8%	7%	15%	
2010	Nº de Amostra	105	145	48	30	78	328	
	%	32%	44%	15%	9%	24%		
Total	Nº de Amostra	629	956	246	200	446	2031	

Considerando a classificação em duas categorias em média, cerca de 10% dos utensílios foram classificados como não satisfatórios (Tabela 14). Foi observado o mesmo

padrão de variação quando as amostras foram analisadas por local (Figura 11). Contudo, nos restaurantes, os utensílios classificados na categoria “mau” decresceu bastante em 2009 (Figura 11).

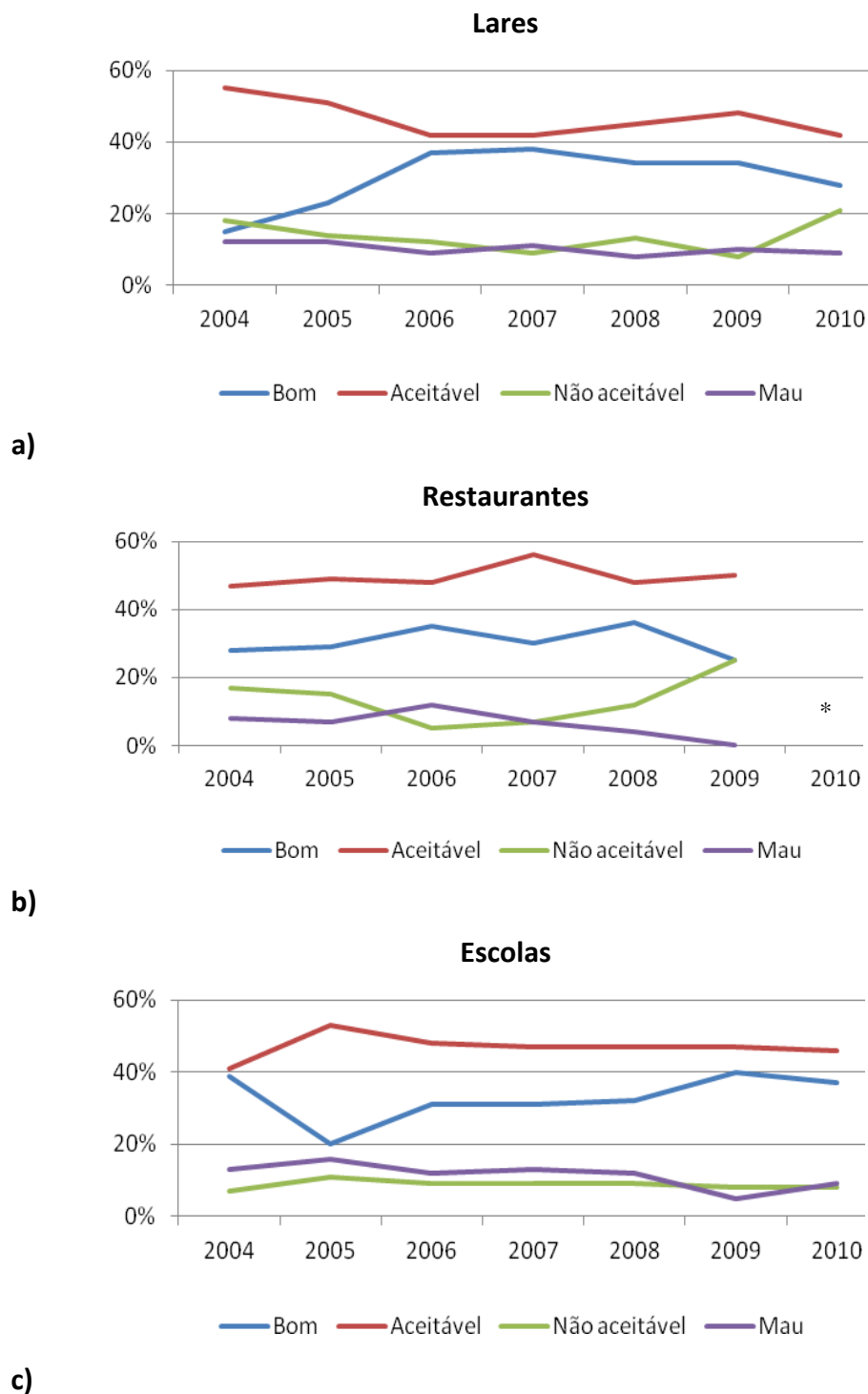


Figura 11 - Evolução da qualidade das amostras de utensílios ao longo dos anos em lares segundo a classificação legislada; a) lares; b) restaurantes; c) escolas. * Sem resultados.

Considerando a classificação em duas categorias, os restantes são os que apresentam menor percentagem de amostras não satisfatórias, contudo, verificou-se um aumento da percentagem de amostras classificadas nesta categoria em 2009 (Figura 12).

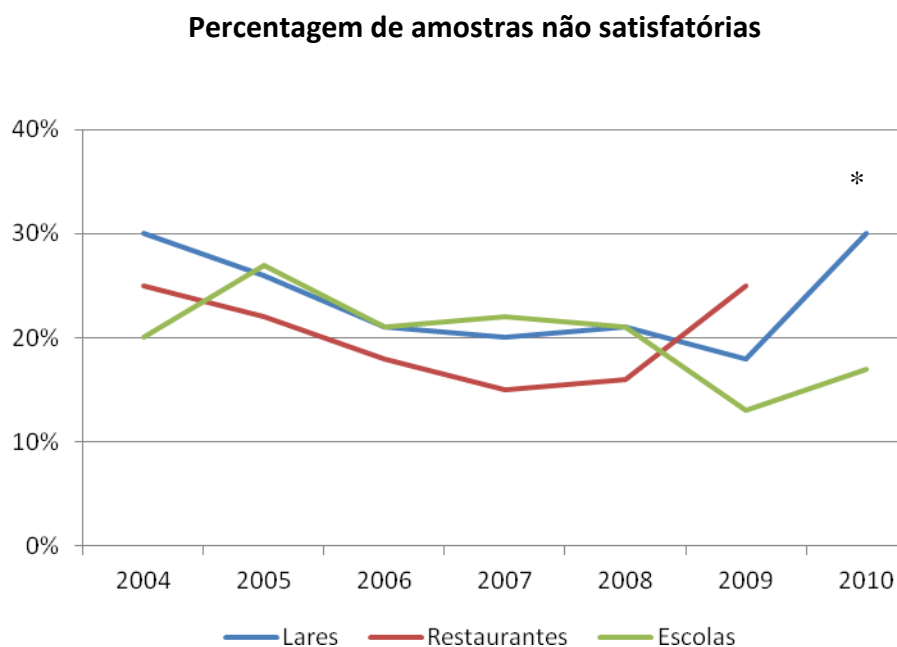


Figura 12 - Evolução das amostras dos utensílios classificadas em duas categorias nos 3 tipos de locais ao longo dos anos. * Sem resultados nos restaurantes.

3.2.3. Avaliação da qualidade microbiológica dos utensílios por parâmetro

Tabela 15 - Classificação pelos parâmetros microbiológicos dos utensílios geral e pelos 3 locais de proveniência segundo a classificação legislada. * VG (valores guia) - expressão dos resultados em ufc/g para todos os parâmetros.

	Total	VG*	Bom Nº de amostra	%	VG*	Aceitável Nº de amostra	%	VG*	Não aceitável Nº de amostra	%	VG*	Mau Nº de amostra	%
Geral													
Microrganismos a 30°C	2031	<5	832	41%	$\leq 10^2$	787	39%	$>10^2 \leq 10^4$	387	19%	$>10^4$	25	1%
Leveduras	2031	0	1685	83%	$\leq 10^2$	309	15%	$>10^2 \leq 10^3$	28	1%	$>10^3$	9	1%
Bolores	2031	0	1298	63%	$\leq 10^2$	711	35%	$>10^2 \leq 10^3$	13	1%	$>10^3$	9	1%
Coliformes totais	2031	0	1845	91%	0	0	0%	0	0	0%	≥ 1	186	9%
Coliformes fecais	2031	0	2006	99%	0	0	0%	0	0	0%	≥ 1	25	1%
Lares													
Microrganismos a 30°C	696	<5	334	48%	$\leq 10^2$	208	30%	$>10^2 \leq 10^4$	147	21%	$>10^4$	8	1%
Leveduras	696	0	593	85%	$\leq 10^2$	92	13%	$>10^2 \leq 10^3$	6	1%	$>10^3$	5	1%
Bolores	696	0	469	67%	$\leq 10^2$	215	31%	$>10^2 \leq 10^3$	7	1%	$>10^3$	5	1%
Coliformes totais	696	0	630	91%	0	0	0%	0	0	0%	≥ 1	66	9%
Coliformes fecais	696	0	685	98%	0	0	0%	0	0	0%	≥ 1	11	2%
Restaurantes													
Microrganismos a 30°C	484	<5	178	37%	$\leq 10^2$	206	42%	$>10^2 \leq 10^4$	99	20%	$>10^4$	1	1%
Leveduras	484	0	381	79%	$\leq 10^2$	88	18%	$>10^2 \leq 10^3$	12	2%	$>10^3$	3	1%
Bolores	484	0	319	65%	$\leq 10^2$	160	33%	$>10^2 \leq 10^3$	2	1%	$>10^3$	3	1%
Coliformes totais	484	0	447	92%	0	0	0%	0	0	0%	≥ 1	37	8%
Coliformes fecais	484	0	479	99%	0	0	0%	0	0	0%	≥ 1	5	1%
Escolas													
Microrganismos a 30°C	851	<5	386	45%	$\leq 10^2$	308	36%	$>10^2 \leq 10^4$	141	17%	$>10^4$	16	2%
Leveduras	851	0	711	84%	$\leq 10^2$	129	15%	$>10^2 \leq 10^3$	11	1%	$>10^3$	0	0%
Bolores	851	0	510	59%	$\leq 10^2$	336	39%	$>10^2 \leq 10^3$	4	1%	$>10^3$	1	1%
Coliformes totais	851	0	768	90%	0	0	0%	0	0	0%	≥ 1	83	10%
Coliformes fecais	851	0	842	99%	0	0	0%	0	0	0%	≥ 1	9	1%

O grupo dos coliformes totais e os microrganismos a 30°C foram os parâmetros que mais frequentemente ultrapassaram o valor legislado independentemente da proveniência das amostras (Tabela 15).

Tabela 16 - Classificação pelos parâmetros microbiológicos dos utensílios para tipos de 3 locais segundo a classificação em duas categorias. * VG (valores guia) - expressão dos resultados em ufc/g para todos os parâmetros.

Parâmetros	Nº total de amostras	Valores Guia	Nº de amostras fora dos valores limites	
			Nº de amostra	%
Geral				
Microrganismos 30ºC	2031	>10 ²	412	20%
Leveduras	2031	>10 ²	37	2%
Bolores	2031	>10 ²	22	1%
Coliformes totais	2031	≥1	186	9%
Coliformes fecais	2031	≥1	25	1%
Lares				
Microrganismos 30ºC	696	>10 ²	155	22%
Leveduras	696	>10 ²	11	2%
Bolores	696	>10 ²	12	2%
Coliformes totais	696	≥1	66	9%
Coliformes fecais	696	≥1	11	2%
Restaurantes				
Microrganismos 30ºC	484	>10 ²	100	21%
Leveduras	484	>10 ²	15	3%
Bolores	484	>10 ²	5	1%
Coliformes totais	484	≥1	37	8%
Coliformes fecais	484	≥1	5	1%
Escolas				
Microrganismos 30ºC	851	>10 ²	157	18%
Leveduras	851	>10 ²	11	1%
Bolores	851	>10 ²	5	1%
Coliformes totais	851	≥1	83	10%
Coliformes fecais	851	≥1	9	1%

Considerando a classificação em duas categorias (Tabela 16), os microrganismos a 30°C para o conjunto de três locais ultrapassaram o valor limite em 20% das amostras. Os lares apresentaram uma maior percentagem acima do valor limite. Os coliformes totais ultrapassam o valor limite em 9% das amostras estudadas. Para este parâmetro as escolas apresentaram o maior número de amostras com valor superior ao valor limite (Tabela 16).

4. Discussão

A contaminação microbiológica dos alimentos tem sido uma preocupação nos últimos anos, contudo, em Portugal apesar de serem efetuadas análises periódicas aos alimentos prontos a comer, estes dados são relativamente escassos e/ou não estão publicados.

Os resultados deste estudo permitiram concluir que (1) dos três grupos de alimentos estudados (alimentos cozinhados, alimentos mistos e saladas), o grupo dos alimentos mistos foi o que apresentou pior qualidade microbiológica (41% de amostras não satisfatórias); (2) dos três tipos de locais estudados (restaurantes, lares e escolas), os restaurantes apresentaram uma maior percentagem de alimentos não satisfatórios (25% de amostras não satisfatórias); (3) dos microrganismos indicadores analisados, os microrganismos a 30°C foram os que mais contribuíram para a má qualidade dos alimentos (o valor limite foi ultrapassado em 19% das amostras); (4) ao longo do período de estudo (sete anos) a qualidade dos alimentos mistos, saladas e alimentos cozinhados melhorou nos três tipos de estabelecimentos; (5) o *S. aureus* foi o patogénico que mais frequentemente ultrapassou o valor limite (1% das amostras) nos três tipos de alimentos e nos três tipos de estabelecimentos; (6) os utensílios podem ser focos importantes de contaminação dos alimentos.

Os alimentos estudados foram classificados de acordo com a legislação em vigor para cada grupo de alimentos. Nos três tipos de locais de colheita, restaurantes, escolas e lares, verificou-se que os alimentos mistos apresentaram a pior qualidade microbiológica (41% das amostras não satisfatórias). A contaminação deste tipo de alimentos mistos pode ser explicada pelo facto de alguns ingredientes deste grupo de alimentos não serem cozinhados, ou seja, não sofrerem tratamento térmico. Alguns dos microrganismos neles existentes não são inativados e outros que podem ser acrescentados durante o processamento dos alimentos pelos manipuladores. A falta de conhecimento por parte dos manipuladores das regras de segurança e higiene alimentar, pode por em causa a qualidade do produto final. Num estudo realizado por Martins (2011), foram avaliados os conhecimentos dos manipuladores sobre segurança e higiene alimentar de uma cadeia de restaurante. Menos de metade dos utilizadores tinha conhecimentos sobre os

procedimentos básicos das regras de segurança e higiene alimentar. Resultados semelhantes foram obtidos por Morais *et al.* (2007), apenas 25% dos manipuladores responderam corretamente às perguntas sobre segurança e higiene alimentar. Um estudo realizado por Angelillo *et al.* (2000) em Itália, mostrou, contudo, que mais de metade dos manipuladores responderam corretamente ao inquérito sobre os procedimentos básicos das regras de segurança e higiene alimentar. Isara & Isah (2009), em Benim, também verificaram que 98% (350 inquiridos) dos manipuladores tinham um bom conhecimento em higiene e segurança alimentar.

As saladas foram do ponto de vista de qualidade microbiológica classificadas em segundo lugar (36% amostras não satisfatórias). Este grupo de alimentos é composto apenas por alimentos crus (saladas, vegetais e fruta). A contaminação deste grupo de alimentos pode ter várias explicações. A ausência de tratamento térmico, assim como acontece com alguns ingredientes dos pratos mistos, pode ser explicado pelo alto manuseamento e pelas condições de armazenamento a que estes alimentos são submetidos (temperatura e percentagem de humidade). Os resultados obtidos por Dolinger *et al.* (2010), mostraram que 73,9% das amostras de saladas foram elevadas como não satisfatórias. Neste estudo, as saladas foram o grupo de alimentos que apresentou pior qualidade microbiológica. Outro estudo mostrou que 84% das 144 amostras de alfaces prontas para consumo recolhidas em restaurantes de universidades em Barcelona (Espanha) estavam contaminadas bacteriologicamente, passou os valores limites (Soriano *et al.*, 2000).

O grupo dos alimentos cozinhados (90%) foi o que apresentou melhor qualidade microbiológica. Este grupo de alimentos sofre tratamento térmico o que inativa os microrganismos neles existentes. A contaminação deste tipo de alimentos cozinhados (10% de amostras não satisfatórias) pode ter origem nas más práticas de higiene dos manipuladores após a confeção, à utilização de baixas temperaturas, tempo de aquecimento e às más condições de armazenamento após confeção.

Dos três tipos de locais (restaurantes, lares e escolas) verificou-se que os restaurantes (25%) apresentam a pior qualidade microbiológica. A contaminação neste tipo de locais pode ser explicada pelo maior desleixo nas condições de higiene e de segurança dos

manipuladores. Relativamente aos outros dois tipos de instituições, nestas são preparados alimentos para crianças e idosos e, como tal, os cuidados durante a preparação devem ser mais rigorosos. Estudos realizados por Buzby *et al.* (1996) e por Pinheiro *et al.* (2010) também apontam os restaurantes como mais implicados na transmissão de toxinfecções alimentares. Neste estudo mais de 60% das intoxicações foram associadas ao consumo de alimentos contaminados servidos em restaurantes.

Ao longo do período de estudo (sete anos) a qualidade dos alimentos mistos, saladas e alimentos cozinhados melhorou nos três tipos de estabelecimentos. No ano 2004 (início do estudo), 75% dos alimentos apresentou boa qualidade microbiológica e em 2010 esta percentagem subiu para 87%. Esta melhoria pode ser explicada pelo facto de ao longo dos anos se ter sido implementado o sistema HACCP e pela vigilância por parte das autoridades ter sido maior e mais rigorosa. De facto a implementação do sistema HACCP nestes estabelecimentos passou a ser obrigatória a partir de 2004.

No entanto, a implementação do sistema HACCP na área de restauração tem sido difícil. Hielm *et al.* (2006), questionou 870 empregados, que trabalhavam ou geriam 30 empresas que mostraram ter dificuldades na implementação do sistema HACCP. As dificuldades mais frequentes foram a escolha dos pontos críticos. Outro estudo, envolvendo 444 manipuladores de 104 pequenas empresas, em que o objetivo era a avaliação dos conhecimentos de higiene alimentar dos manipuladores, mostrou que os funcionários não tinham os conhecimentos de higiene básicos, nomeadamente na limpeza de superfícies, o que foi um obstáculo na implementação eficaz do sistema HACCP nesses estabelecimentos (Walker *et al.*, 2003).

Os microrganismos que mais contribuíram para a má qualidade dos alimentos foram os microrganismos a 30°C (19%). Estes microrganismos são utilizados para verificar as boas práticas de processamento. A contaminação dos alimentos por estes microrganismos pode ser explicada por vários fatores, tais como, má qualidade das matérias-primas, má manutenção dos equipamentos e dos locais de processamento, falta de higiene por parte do pessoal e más condições de armazenamento. O estudo de Rosa (2002) também mostrou que os microrganismos a 30°C estavam muito implicados na má qualidade de hortaliças minimamente processadas, 94% (140 amostras) continham

microrganismos a 30°C superiores aos valores limite. Outros trabalhos também mostraram elevadas contagens deste indicador em hortaliças (Sazabo *et al.*, 2000). Neste trabalho foram analisadas 120 amostras de saladas prontas para consumo e 76% das amostras apresentavam teores de microrganismo a 30°C acima dos valores legislados.

Em todos os alimentos estudados nos três tipos de locais, dos microrganismos patogênicos pesquisados, os *Staphylococcus aureus* foram os microrganismos que mais frequentemente ultrapassaram o valor legislado. A presença dos *S. aureus* é regular nos alimentos cuja preparação exige uma maior manipulação por parte do pessoal (como salsichas e saladas). Mesmo que os produtos de origem animal crus e os equipamentos quando mal lavados possam introduzir estes tipos de contaminação, os manipuladores têm sido apontados como a principal fonte, especialmente nos alimentos cozinhados. Um estudo realizado por Pereira *et al.* (1994) com 55 indivíduos que manipulavam alimentos numa cozinha industrial mostrou que 58,2% deles apresentavam *S. aureus*. Em 30,9% dos casos o *S. aureus* foi detetado no nariz, tendo sido também detetado nas unhas. Neste estudo 35% dos alimentos servidos nesta cozinha estavam contaminados com *S. aureus*. Um estudo parecido, de Loeto (2007), foi detetado *S. aureus* em 115 (57,5%) manipuladores. Os *S. aureus* foram isolados nas mãos, cavidade nasal e rosto. Aycicek *et al.* (2005) estudou 512 amostras de alimentos prontos a servir num refeitório militar na Turquia e observou que, 48 amostras (9,4%) tinham *S. aureus*.

Os resultados deste estudo indicam que a contaminação dos utensílios pode influenciar a qualidade dos alimentos. Os utensílios usados nos lares apresentaram a pior qualidade microbiológica (24% das amostras ultrapassaram o valor limite. Nos restaurantes e nas cantinas 23% e 20%, respetivamente, das amostras de utensílios continham microrganismos acima dos valores legislados. A contaminação destes utensílios só pode ser explicada pela falta de higienização dos mesmos por parte dos manipuladores. Os utensílios, mal higienizados podem ser responsáveis por uma percentagem elevada da contaminação dos alimentos. Abreu *et al.* (2010) mostrou que 16% das intoxicações alimentares é causada pelos utensílios contaminados.

Durante o período de estudo a qualidade dos utensílios, tal como a dos alimentos veio a melhorar. O aumento de qualidade dos utensílios acompanhou o aumento da

qualidade dos alimentos até 2009. Em 2010 houve, no entanto, uma diminuição na qualidade microbiológica dos utensílios, de 9%, que não foi observada nos alimentos. O aumento da qualidade dos utensílios entre 2004 e 2009 pode ser explicado pela aplicação do HACCP que inclui também o controlo da higienização dos utensílios e também pelo aumento da vigilância por parte das autoridades.

Nos utensílios analisados também se verificou que microrganismos a 30°C foram os que mais contribuíram para a má qualidade microbiológica (em 20% dos casos). Um estudo realizado numa instituição de ensino superior, realizado por Pinheiro *et al.* (2010), detetou que 90% das tábuas de corte estavam contaminadas por microrganismos a 30°C, bolores, leveduras e coliformes totais. Contudo, Andrade *et al.* (2003), analisou equipamentos e utensílios, mostrando que apenas 18,6% destes apresentavam contagens de microrganismos a 30°C acima do valor limite. A análise de utensílios em restaurantes, mostram que estes não estavam contaminados por microrganismos a 30°C, nem por bolores e leveduras (Abreu *et al.*, 2010). Leles *et al.* (2005) observaram que apenas 3,6% das amostras de utensílios estavam contaminadas com coliformes totais. Blume & Ribeiro (2006) também não detetaram níveis de contaminação microbiológica em utensílios que pusessem em riscos a saúde dos consumidores.

Apesar da implementação do sistema HACCP nos estabelecimentos de restauração em Portugal em 1998, a percentagem de alimentos prontos a comer, servidos nestes estabelecimentos, que apresentam má qualidade microbiológica é ainda muito alta (18% em média).

5. Bibliografia

Abrahão, P. (2005). *Ocorrência de Listeria monocytogenes e de outros microrganismos em gelados comestíveis fabricados e comercializados na região metropolitana de Curitiba, Paraná.* Dissertação apresentada à Faculdade Federal do Paraná de Curitiba. pp. 14-40.

Abreu, E., Simony, R., Dias, D., Ribeiro, F., Gonçalves, P., Pinesi, P. (2010). Eficácia dos métodos de higiene de utensílios em restaurantes comerciais. *Rev. Simbio-Logias*. Vol. 3, 5, pp. 132-143.

Abreu, M., Junqueira, A., Peixoto, J., Oliveira, S. (2010). Qualidade microbiológica e produtividade de alface sob adubação química e orgânica. *Ciência Tecnológica Alimentar, Campinas*. ISSN 0101-2061, pp. 108-118.

Aguilera, M., Stagnitta, P., Micalizzi, B., Guzmán, A. (2005). Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* from spices in Argentina. *Anaerobe*. Vol. 11, 6, pp. 327–334.

Al-Goblan, A. & Jahan, S. (2010). Surveillance for foodborne illness outbreaks in Qassim, Saudi Arabia, 2006. *Foodborne pathogens and disease*. Vol. 7, 12, pp. 1559-1562.

Altekruse, S., Street, D., Fein, S., Levy, A. (1996). knowledge of food handling practices and microbial food poisoning risks. *Journal of Food Protection*. Vol. 59, pp. 287-294.

Alves, M. & Ueno, M. (2010). Restaurantes *self-service*: segurança e qualidade sanitária dos alimentos servidos. *Revista de Nutrição*. Vol. 23, 4 pp. 573-580.

Ambrozic, M., Jevsnik, M., Raspor, P. (2010). Inconsistent terminology in food safety field: a permanent risk factor? *Journal of Food and Nutrition Research*. Vol. 49, 4, pp. 186-194.

Andrade, N., Silva, R., Brabes, K. (2003). Avaliação das condições microbiológicas em unidades de alimentação e nutrição. *Ciênc. Agrotec.* Vol. 27, n.º 3, pp. 590-596.

Angelillo, I., Viggiani, N., Rizzo, L., Bianco, A. (2000). Food handlers and foodborne diseases: knowledge, attitudes and behaviour reported in Italy. *Journal of Food Protection.* Vol. 63, pp. 381-385.

Araújo, M. (1997). *Segurança alimentar - Os perigos para a saúde através dos alimentos.* Lisboa, Meribérica/Liber.

Assão, T., Cordeiro, A., Costa, C., Cervato, A. (2007). Food security practices and perceptions among representatives of institutions of a reference center located in Butantã region. *Saúde e Sociedade.* Vol. 16, 1, pp. 102-116.

Aycicek, H., Cakiroglu, S., Stevenson, T. (2005). Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. *Food Control.* Vol. 16, 6, pp. 531-534.

Balbani, A. & Butugan, O. (2001). Contaminação biológica de alimentos. *Revisão e Ensaio.* Vol. 23, 4, pp. 320-328.

Batista, P. & Antunes, C. (2005). *Higiene e Segurança Alimentar na Restauração.* 1ª edição. Forvisão - Consultoria em Formação Integrada. Vol.II.

Batista, P. & Venâncio, A. (2003). Os perigos para a segurança alimentar no processamento de alimentos. 1ª edição. *Forvisão - Consultoria em Formação Integrada* pp. 1-109.

Belik, W. (2003). Prospects for food and nutritional safety in Brazil. *Saúde e Sociedade.* Vol. 12, 1, pp. 12-20.

Blume, I. & Ribeiro, A. (2006). Qualidade sanitária de talheres e pratos utilizados no restaurante - escola da universidade federal de Pelotas - UFPEL. Obtido em 7 de Out. de 2011, de http://www.ufpel.edu.br/cic/2006/resumo_expandido/CB/CB_01064.pdf

Borsoi, A., Moraes, H., Salle, C., Nascimento, V. (2010). Most probable number of *Salmonella* isolated from refrigerated broiler carcasses. *Ciência Rural*. Vol. 40, 11, pp. 2338-2342.

Büla, C., Bille, J., Glauser, M. (1995). An epidemic of food-borne listeriosis in Western Switzerland: decryption of 57 cases involving adults. *Clinical Infectious Diseases, Chicago*. Vol. 20, 1, pp. 66-72.

Burri, S., Vale, P. (2006). Contaminação de bivalves por DSP: risco de episódios de gastroenterites numa região de toxicidade endêmica. *Revista portuguesa de saúde pública*. Vol. 24, 1, pp. 115-124.

Buzby, J., Roberts, T., Lin, J., Macdinald, M. (1996). Bacterial foodborne disease: medical costs and productivity losses. *United States Department of Agriculture*. vol. 81, pp. 1-29.

Carrique-mas, J., Hökeberg, I., Anderson, Y., Arneborn, M., Tham, W., Danielsson-tham, M., Osterman, B., Leffler, M., Steen, M., Eriksson, E., Hedin, G., Giesecke, J. (2003). Febrile gastroenteritis after eating on-farm manufactured fresh cheese – an outbreak of listeriosis? *Epidemiology and Infection*. Vol. 130, 1, pp. 79-86.

Castro, J. (2011). *Listeria monocytogenes* em alimentos prontos para consumo. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa.

Cerf, O. & Donnat, E. (2011). Application of hazard analysis e Critical control point (HACCP) principles to primary production: What is feasible and desirable? *Food Control*. Vol. 22, pp. 1839-1843.

Codex Alimentarius (2006). Food Hygiene Basic Texts. *Pan-Americana da Saúde /Organização Mundial da Saúde*. pp. 1-61.

Cunha, A. & Cunha, M. (2007). Toxinfecção alimentar por *Staphylococcus aureus* através do leite e seus derivados, bem como o elevado potencial patogénico de resistência às drogas. *Revista Saúde & Ambiente*. Vol. 2, 1, pp. 105-114.

Dolinger, E., Melo, P., Moraes, G., Silva, C., Brito, D. (2010). Contaminação microbiológica de alimentos comercializados em restaurantes de auto-serviço de Itumbiara-GO. *Biotemas*. Vol. 23, 4, pp. 129-133.

Eley, A. (1996). *Microbial Food Poisoning*. 2ª edição. Chapman & Hall.

Fagundes, H. & Oliveira, C. (2004). Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em saúde pública. *Ciência Rural*. ISSN 0103-8478, Vol. 34, 4, pp. 1315-1320.

Fawzi, M., Goma, N., Bakr, W. (2009). Evaluation of hand washing, personal, hygiene and quality hand washes bacteriologica in some supermecados and dairy shops in Alexandria, Egypt. *The Journal of the Egyptian Public Health Association*. Vol. 84, pp. 71-93.

Ferreira, S. (2006). *Contaminação de alimentos ocasionados por manipuladores*. Dissertação apresentada CET – Centro de Turismo da Universidade de Brasília. pp. 23-30.

Ferreira, W. & Sousa, J. (2000). *Microbiologia* (Vol. 2). Lidel-edições técnicas.

Ferreira, W., Sousa, J., Lima, N. (2010). *Microbiologia*. Lidel-Edições técnicas.

Figueiredo, V. & Neto, P. (2001). Implantação do HACCP na indústria de alimentos. *Gestão e Produção*. Vol. 8, 1, pp. 100-111.

FQA - (Formação Qualidade e Auditoria Agro-Alimentar), (2002). HACCP - Manual de formação. *Departamento de Ciências e Tecnologias Alimentares da Escola Superior Agrária de Coimbra, Projecto AGRO DE&D n.º44.* pp. 1-26.

Garayoa, R., Vitas, A., Diez-Leturia, M., Garcia-Jalón. (2011). Food safety and the contract catering companies: Food Handlers, facilities and HACCP evaluation. *Food Control.* Vol. 22, pp. 2006-2012.

Garrelha, H. (2008). Aplicação dos princípios de HACCP para hotelaria restauração. *Código de boas práticas de higiene e segurança alimentar.* pp. 1-82.

Gilbert, R., Louvois, J., Donovan, T., Little, C., Nye, K., Ribeiro, C., et al. (2000). Guidelines for the microbiological quality of some ready-to-eat foods sampled at the point of sale. *Communicable Disease and Public Health.* Vol. 3, 3, pp. 163-167.

Gonçalves, M. (2009). *Higiene e Segurança Alimentar em Cantinas Hospitalares e Satisfação dos utilizadores.* Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. pp. 1-113.

Heritage, J., Evans, G., Killington, D. (1999). Microbiologia em Acção. *Ciência Replicação, Lda.*

Hielm. (2006). Attitudes towards own-checking and HACCP plans among finnish food industry employees. *Food Control.* Vol. 17, pp. 402-407.

INSA. (2006). *Manual - Cinco chaves para uma alimentação mais segura.* Portugal: Organização Mundial da Saúde.

Isara, A., Isah, E., Lofor, P., Ojide, C. (2010). Food contamination in fast food restaurants in Benin City, Edo State, Nigeria: Implications for food hygiene and safety. *Public Health*. Vol. 124, 8, pp. 467-471.

Isara, R., & Isah, E. (2009). Knowledge and practice of food hygiene and safety between food handlers in fast food restaurants in Benin, Edo State. *The Nigerian pós-medical journal*. Vol. 16, 3, pp. 207-212.

ISO 4833:2003, (2003), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Colony-count technique at 30°C.

ISO 7954:1987, (1987), Microbiology - General guidance for enumeration of yeasts and moulds - Colony count technique at 25°C.

ISO 4832:2006, (2006), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coliforms - Colony-count technique.

ISO 16649-2:2001, (2001), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 2: Colony-count technique at 44° C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.

ISO 6888-1:1999, (1999), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species) - Part 1: Technique using Baird-Parker agar medium.

ISO 6579:2002, (2002), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella spp.*

ISO 11290-2:1998, (1998), Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method.

Jacxsens, L., Kussaga, J., Luning, P., Van der Spiegel, M., Devlieghere, F., Uyttendaele. (2009). A microbial assessment scheme to measure microbial performance of food safety management systems. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 134, pp. 113-125.

Jorge, C. (2008). *Sistema HACCP na restauração colectiva: concepção de um plano HACCP para implementação no serviço de refeições de um Hospital*. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa. pp. 1-77.

Kam, M., Tsang, D., Yuen, Y. (2001). Microbiological Guidelines for Ready-to-eat Food. *Food and Environmental Hygiene Department* , pp. 1-10.

Lacasse, D. (1995). *Introdução à microbiologia alimentar*. Ciência e Técnica. Lisboa, Instituto Piaget.

Leite, I. & Waissamann, W. (2006). Doenças transmitidas por alimentos na população idosa: Risco e Prevenção. *Revista Ciência e Médica*. Vol. 15, 6, pp. 525-530.

Leles, P. (2005). Talheres de restaurantes self-service: contaminação microbiana. *Revista Higiene Alimentar*. Vol. 19, 131, pp. 72-76.

Loeto, D., Matsheka, M., Gashe, B. (2007). Destinations and resistencia to antibiotics determination of *Staphylococcus aureus* strains isolated from food handlers in Gaborone Botswana. *Journal of food Protection*. Vol. 70, 12, pp. 2764-2768.

Loureiro, M. (2009). *Código de boas práticas de segurança alimentar (HACCP) na restauração temporária*. Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia Alimentar da Universidade de Coimbra. pp. 1-27.

Makino, S., Kawamoto, K., Takeshi, K., Okada, Y., Yamasaki, M., Yamamoto, S., Igimi, S. (2005). An outbreak of food-borne listeriosis due to cheese in Japan, during 2001. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 104, 2, pp. 189-196.

Martinelli, C. (2007). *Avaliação microbiológica de produtos carneos distribuídos aos pacientes em um hospital particular de volta Redonda*. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade de Rio de Janeiro. pp. 4-17.

Martins, R., Hogg, T., Otero, J. (2011). Food handlers' knowledge on food hygiene: The case of a catering company in Portugal. *Food control*. Vol. 23, pp. 184-190.

Mendes, P. (2009). *Determinação da vida útil de 2 grupos de alimentos prontos a comer comercializados em estabelecimentos de Take-away*. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. pp. 60-64.

Mitchell, R., Fraser, A., Bearon, L. (2007). Prevention of food-borne disease in food service establishments: extend the scope of intervention and research on food safety handling behaviors. *Environmental Health Research*. Vol. 17, 1, pp. 9-24.

Mogharbel, A. & Masson, M. (2005). Perigos associados ao consumo da alface (*Lactuca sativa*), in natura. *Araraquara*. Vol. 16, pp. 83-88.

Morais. (2007). Small and micro enterprises - aspects of knowledge, attitudes and practices of managers and food handlers knowledge of food safety in the proximity of

Tygerberg. Academic Hospital, Western Cape. *South African Journal of Clinical Nutrition*. Vol. 20, pp. 50-61.

Morgado, A. (2007). *Validação de limites críticos do plano HACCP e a avaliação de risco microbiológico num estabelecimento de restauração*. Dissertação apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa. pp. 78-89.

Neves, M. (2005). Boas práticas agrícolas e a produção orgânica de frutas, legumes e verduras. *Seropédica*. pp. 1-23.

Newell, D. (2010). Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 139, pp. S3-S15.

NP 2262:1986, (1986), Pesquisa de esporos de clostrídios sulfito-redutores.

Osimani, A., Aquilanti, L., Babini, V., Tavoletti, S., Clemante, F. (2011). An eight-year report on the implementation of HACCP in a university canteen: impact on the microbiological quality of meals. *International Journal of Environmental Health Research*. Vol. 21, 2, pp. 120-132.

Pereira, F. (2009). *Auditorias internas aos sistemas de segurança alimentar implementadas em cantinas universitárias*. Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. pp. 1-86.

Pereira, M., Carmo, L., Lara, S., Dias, R. B. (1994). Enterotoxigenic *Staphylococcus* from food handlers working in an industrial kitchen in Belo Horizonte-MG. *Revista de Microbiologia*. Vol. 25, pp. 161-165.

Pérez-Rodríguez, F., Castro, R., Posada-Izquierdo, G., Valero, A., Carrasco, E., García-Gimeno, R., et al. (2010). Evaluation of practices and microbiological quality of meat products during slicing and handling at retail. *Meat Science*. Vol. 86, pp. 479-485.

Pinheiro, M., Wada, T., Pereira, C. (2010). Análise microbiológica de tábuas de manipulação de alimentos de uma instituição de ensino superior em São Carlos, SP. *Revista Simbio – Logias*. Vol. 3, 5, pp. 115-124.

Pinto, A. (1996). Doenças de origem microbiana transmitidas pelos alimentos. *Revista Millenium*. Vol. 4, pp. 91-100.

Regulamento (CE) n.º854/2004. *Jornal Oficial da União Europeia L139 de 30 de Abril: Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas .*

Rosa, O. (2002). Microbiota associada a produtos hortícolas minimamente processadas comercializados em supermercados. *Tese Doutoramento em Ciências de Alimentos. Universidade de Lavras.*

Sanlier, N. (2010). Food safety knowledge and the safe food handling behaviours of female and male consumers. *Pak J. Med Sci*. Vol. 26, 3, pp. 653-658.

Santos, M., Cunha, M., Saraiva, M., Novais, M. (2005). Revista da ordem dos Farmacêuticos. *ROF* . pp. 66-68.

Santos, M., Nogueira, J., Mayan, O. (2007). Condições higio-sanitárias das cantinas escolares de distrito de Vila Real. *Saúde Colectiva*. Vol. 25, 2, pp. 51-58.

Scarcelli, E. & Piatti, R. (2002). Patogénicos emergentes relacionados à contaminação de alimentos de origem animal. *Biológico*. Vol. 64, 2, pp. 123-127.

Sneed, J. & Stronbehn, C. (2008). Trends impacting food safety in retail foodservice: Implications for dietetics practice. *Journal of the American Dietetic Association*. Vol. 108, 7, pp. 1170-1177.

Soriano, J., Rico, H., Manes, J. (2000). Assessment of microbiological quality and wash treatments of lettuce served in University restaurants. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 58, pp. 123-128.

Szabo, E., Scurrah, K., Burrows, J. (2000). Survey for psychrotrophic pathogens in minimally processed lettuce. *Letters in applied microbiology, Oxford*. Vol. 30, 160, pp. 456-460.

Vaerewijck, M., Sabbe, K., Baré, J., Houf, K. (2011). Occurrence and diversity of free-living protozoa on butterhead lettuce. *International Journal of Food Microbiology*. Vol. 147, pp. 105-111.

Veiga, A., Lopes, A., Carrilho, E., Silva, L., Dias, M., Seabra, M., Borges, M., Fernandes, P., Nunes, S. (2009). Perfil de riscos dos principais alimentos consumidos em Portugal. *Autoridade de Segurança Alimentar e Económica*.

Vieros, M., Proença, R., Santos, M., Rocha, L. (2009). Food safety practices in a Portuguese canteen. *Food Control*. Vol. 20, pp. 936-941.

Walker, E., PRITCHARD, C. and FORSYTHE, S. (2003). Food handler's hygiene knowledge in small food businesses. *Food Control*. Vol. 14, 5, pp. 339-343.

WHO, (2002). Foodborne diseases, emerging. Fact sheet n.º 124. Revised January. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs124/en/>.

Referências eletrónicas

[1] http://clientes.netvisao.pt/anterojo/portugal_Dist_Aveiro.htm